



Vers l'imagerie in vivo de l'alpha-synucléine.

Elise Levigoureux

► To cite this version:

Elise Levigoureux. Vers l'imagerie in vivo de l'alpha-synucléine.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10313 . tel-01289089

HAL Id: tel-01289089

<https://theses.hal.science/tel-01289089>

Submitted on 16 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
DELIVREE PAR
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
« NEUROSCIENCES ET COGNITION »

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenu publiquement le 18 décembre 2015

Par

Elise, Lucie, Marie LEVIGOUREUX

VERS L'IMAGERIE *IN VIVO* DE L'ALPHA-SYNUCLEINE

DIRECTEURS DE THESE :

Pr Luc ZIMMER
Dr Sophie LANCELOT

RAPPORTEURS :

Dr Thierry BARON
Pr François DAUPHIN

EXAMINATEURS :

Dr Thierry BILLARD
Pr Denis GUILLOTEAU

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Administrateur provisoire : M. le Professeur G.
KIRKORIAN

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. R. BERNARD

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-
DESCHAMPS

REMERCIEMENTS

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Publications internationales

Levigoureux E, Lancelot S, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, Verchere J, Billard T, Baron T, Zimmer L. *Binding of the PET radiotracer [^{18}F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice*. Curr Alzheimer Res. 2014;11:955-960.

Levigoureux E, Bouillot C, Baron T, Zimmer L, Lancelot S. *Altered brain serotonergic neurotransmission and glucose metabolism in an original mouse model of synucleinopathy*. Neurobiology of aging, soumis

Communications orales dans des congrès internationaux

Levigoureux E, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, Verchere J, Billard T, Baron T, Zimmer L, Lancelot S. *Altered brain serotonergic neurotransmission and glucose metabolism in an original mouse model of synucleinopathy*. EANM Congress, Hamburg, October 2015.

Levigoureux E, Lancelot S, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, Verchere J, Billard T, Baron T, Zimmer L. *Binding of the PET radiotracer [^{18}F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice*. EANM Congress, Göteborg, October 2014.

Communications affichées dans des congrès internationaux

Verdurand M, Mendjel M, **Levigoureux E**, Lancelot S, Zeinyeh W, Alazet S, Billard T, Zimmer L, Chauveau F. *A screening assay in the search of an α -synulcein PET radioligand: an update*. World Molecular Imaging Congress, Sep 2015, Honolulu, USA.

Verdurand M, Mendjel M, **Levigoureux E**, Lancelot S, Zeinyeh W, Alazet S, Billard T, Zimmer L, Chauveau F. *A screening assay in the search of an α -synulcein PET radioligand*. European Molecular Imaging Meeting, Mar 2015, Tubingen, Germany.

Chauveau F, Verdurand M, Ong E, **Levigoureux E**, Lancelot S, Billard T, Zimmer L. *Amyloid-beta1-40 fibril polymorphism : impact on biostability and [^{18}F]AV-45 binding*. European Molecular Imaging Meeting, June 2014, Antwerpen, Belgium.

Alazet S, Zeinyeh W, **Levigoureux E**, Zimmer L, Billard T. *Synthesis and radiolabeling of [^{18}F]BF-227 radiotracer and biological evaluations of the alpha-synuclein*; XIII Turku PET symposium, May 2014, Turku, Finland.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	9
TABLE DES TABLEAUX	12
TABLE DES ABBREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
PARTIE 1 LES SYNUCLEINOPATHIES	19
1. Les synucléinopathies.....	20
1.1. L'alpha-synucléine	20
1.1.1. Généralités.....	20
1.1.2. Localisation	21
1.1.3. Comportement conformationnel	22
1.1.3.1. Conformation physiologique.....	22
1.1.3.2. Conformation pathologique.....	22
1.1.3.3. Facteurs favorisant le passage de l'α-syn sous une conformation pathologique	23
1.1.2. Fonctions.....	25
1.1.2.1. Fonctions physiologiques.....	25
1.1.2.2. Fonctions pathologiques	26
1.2. Les synucléinopathies	28
1.2.1. Les pathologies à corps de Lewy.....	28
1.2.1.1. La maladie de Parkinson (MP).....	29
1.2.1.2. La démence à corps de Lewy (DCL)	34
1.2.2. L'atrophie multisystématisée (AMS).....	36
1.3. L'imagerie des synucléinopathies	40
1.3.1. Principe de la TEP.....	40
1.3.2. Pourquoi développer un radiotraceur des synucléinopathies ?	42
1.3.2.1. L'imagerie actuelle des synucléinopathies.....	42
1.3.2.1.1. Les traceurs TEMP	43
1.3.2.1.2. Les traceurs TEP	46
1.3.2.2. L'alpha-synucléine, une cible pour un biomarqueur	48
1.3.2.2.1. Les limites du dosage biologique de l'alpha-synucléine.....	48
1.3.2.2.2. Un radiotraceur des synucléinopathies.....	49
1.3.3. Les radiotraceurs potentiels de l'alpha-synucléine	49
PARTIE 2 LA NEUROTRANSMISSION SEROTONINERGIQUE DANS LES SYNUCLEINOPATHIES	54
1. La sérotonine	55
1.1. Généralités.....	55
1.2. Métabolisme de la sérotonine	56
1.2.1. Biosynthèse	56
1.2.2. Distribution	58
1.2.3. Catabolisme.....	59
1.3. La sérotonine dans le système nerveux central.....	60
1.3.1. Les corps cellulaires	60
1.3.2. Les projections	63
1.4. Rôle de la sérotonine	63

1.5. Les récepteurs sérotoninergiques.....	67
1.5.1. Généralités	67
1.5.2. Le récepteur 5HT _{1A}	75
1.5.2.1. Généralités	75
1.5.2.2. Distribution.....	76
1.5.2.3. Rôle.....	78
1.5.2.4. Imagerie TEP des récepteurs 5-HT _{1A}	78
1.6. Le transporteur SERT	83
1.6.1. Généralités	83
1.6.2. Imagerie du transporteur SERT	85
2. Sérotonine et synucléinopathies	87
2.1. Sérotonine et maladie de Parkinson.....	87
2.1.1. SERT et MP	89
2.1.2. La modulation du transporteur SERT dans la MP	91
2.1.3. Récepteurs 5-HT _{1A} et MP	93
2.1.4. La modulation du récepteur 5-HT _{1A} dans la MP.....	94
2.1.4.1. Études pré-cliniques.....	94
2.1.4.2. Études cliniques	95
2.2. Sérotonine et autres synucléinopathies	96
PARTIE 3 METABOLISME GLUCIDIQUE ET SYNUCLEINOPATHIES.....	98
1. Le [¹⁸ F]fluorodesoxyglucose	99
2. Exploration du métabolisme du glucose et synucléinopathies	101
ETUDE EXPERIMENTALE	102
PARTIE 1 INTERETS ET LIMITES PRE-CLINIQUES DU [¹⁸F]BF227	103
1. Objectif	104
2. Matériels et méthodes	104
2.1. Radiosynthèse du [¹⁸ F]BF227.....	104
2.2. Modèles animaux de synucléinopathies	105
2.3. Etudes <i>in vitro</i>	107
2.3.1. Autoradiographie	107
2.3.2. Coloration à la thioflavine S	108
2.3.3. Immuno-analyses.....	109
2.4. Etudes <i>in vivo</i>	109
2.4.1. Imagerie microIRM	109
2.4.2. Imagerie microPET	111
2.4.3. Analyse des résultats	112
3. Résultats	113
3.1. Radiosynthèse du [18F]BF227	113
3.2. Etudes <i>in vitro</i>	114
3.2.1. Autoradiographie	114
3.2.2. Coloration à la thioflavine S	115
3.2.3. Immuno-analyses.....	116
3.3. Etudes <i>in vivo</i>	117
4. Discussion et perspectives.....	120
PARTIE 2 EVALUATION DE NOUVELLES MOLECULES CANDIDATES COMME RADIOTRACEUR DE L'A-SYN	124
1. Objectif	125
2. Matériels et méthodes	125
2.1. Mise au point de la technique de binding <i>in vitro</i>	125
2.1.1. Principe	125
2.1.2. Préparation des homogénats d'hippocampe	127
2.1.3. Radiosynthèse du [¹⁸ F]MPPF.....	128
2.1.4. Binding sur filtres	130

2.1.5. Transposition de la technique aux fibrilles α -syn et A β 1-42	131
2.1.5.1. Préparation des fibrilles	131
2.1.5.2. Caractérisation des fibrilles	132
2.1.5.2.1. Coloration à la Thioflavine S	132
2.1.5.2.2. Caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET)	133
2.1.5.3. Binding sur filtres	133
2.2. Evaluation de l'affinité de molécules candidates	135
3. Résultats	138
3.1. Mise au point de la technique de binding <i>in vitro</i>	138
3.2. Transposition de la technique aux fibrilles α -syn et A β 1-42	139
3.2.1. Caractérisation des fibrilles.....	139
3.2.1.1. Coloration à la thioflavine S	139
3.2.1.2. Caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET)	139
3.2.2. Evaluation de l'affinité du [18 F]BF227 pour les fibrilles d' α -syn et d'A β 1-42	140
3.4. Evaluation de l'affinité des molécules	141
4. Discussion et perspectives.....	144
PARTIE 3 ETUDE D'IMAGERIE FONCTIONNELLE SUR MODELE ACCELERE DE SYNUCLEINOPATHIES	148
1. Objectifs	149
2. Matériels et méthodes	149
2.1. Etude d'imagerie fonctionnelle	149
2.1.1. Radiotraceurs.....	149
2.1.1.1. [18 F]FDG.....	149
2.1.1.2. [18 F]MPPF	149
2.1.1.3. [11 C]DASB.....	149
2.1.2. Animaux	151
2.1.3. Etude d'imagerie microTEP.....	153
2.1.4. Etude d'imagerie microIRM	154
2.1.5. Analyse des résultats	154
2.2. Extraction et dosage de la sérotonine (5HT) et de l'acide 5-hydroxyindoleacetic (HIAA) au niveau cérébral.....	155
3. Résultats	156
3.1. Analyse immunohistochimique de l' α -synucléine	156
3.2. Etude d'imagerie microTEP	157
3.3. Dosage de la 5-HT et du 5HIAA cérébraux.....	159
4. Discussion et perspectives.....	161
CONCLUSION GENERALE	166
BIBLIOGRAPHIE.....	169

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Structure de l'alpha-synucléine et domaines de prédilection

Figure 2 : Agrégation de l'α-syn

Figure 3 : Illustrations de corps de Lewy et de neurites de Lewy

Figure 4 : Traitement médicamenteux des troubles moteurs au début de la MP

Figure 5: Traitement médicamenteux des troubles moteurs au stade avancé

Figure 6 : Critères de diagnostic cliniques de la DCL

Figure 7 : Images microscopiques d'atrophie multisystématisée

Figure 8 : Principe d'une caméra TEP

Figure 9 : Images SPECT après injection de [^{123}I]FP-CI

Figure 10 : Images scintigraphiques précoces réalisées au [^{123}I]MIBG

Figure 11 : Images TEP obtenus après injection de [^{18}F]F-DOPA

Figure 12 : Visualisation de la charge amyloïde par des agents d'imagerie TEP de la plaque amyloïde : le [^{18}F]florbetaben, le [^{18}F]florbetapir et le [^{18}F]flutemetamol

Figure 13 : Distribution du [^{11}C]BF227 chez des patients atteints d'AMS versus des sujets témoins

Figure 14 : Structure chimique de la sérotonine (5HT)

Figure 15 : Principales voies métaboliques du tryptophane

Figure 16 : Biosynthèse de la sérotonine

Figure 17 : Catabolisme de la sérotonine

Figure 18 : Schéma d'une coupe sagittale de cerveau humain représentant la distribution du système sérotoninergique

Figure 19 : Représentation d'un neurone sérotoninergique

Figure 20 : Localisation des différents types de récepteurs centraux de la 5-HT par rapport aux neurones sérotoninergiques

Figure 21 : Structure moléculaire du récepteur 5-HT_{1A}

Figure 22 : Radiotraceurs des récepteurs 5-HT_{1A}

Figure 23 : Distribution des récepteurs 5HT1A dans le cerveau humain

Figure 24 : Structure chimique du [¹¹C]DASB

Figure 25 : Distribution du transporteur de la sérotonine SERT dans le cerveau humain

Figure 26 : Radiosynthèse du [¹⁸F]FDG

Figure 27 : Schéma de la radiosynthèse du [¹⁸F]BF227.

Figure 28 : Schéma de la distribution de l'α-syn-pathologique chez des souris TgM83

Figure 29 : Principe d'une caméra TEP dédiée à l'animal ou microTEP

Figure 30 : Chromatogramme du contrôle qualité du [¹⁸F]BF227

Figure 31 : Autoradiogrammes *in vitro* de coupes de cerveau de souris TgM83 (A et A') et de souris KO en α-syn (B et B') incubées avec [¹⁸F]BF227.

Figure 32 : Coloration à la thioflavine S de coupes de cerveau de souris TgM83.

Figure 33 : Analyse en Western Blot des homogénats de cerveaux de souris.

Figure 34 : Images microIRM d'une souris TgM83.

Figure 35 : Images microTEP d'une souris TgM83 (A) et d'une souris KO α-syn (B).

Figure 36 : Cinétique du [¹⁸F]BF227 au niveau du cerveau de souris TgM83

Figure 37 : SUVR pour le [¹⁸F]BF227 chez les souris TgM83

Figure 38 : Principe de l'étude de binding sur filtres

Figure 39 : Dispositif de filtration sous vide pour la réalisation de l'étude de binding sur filtres

Figure 40 : Schéma de la réaction de radiosynthèse du [¹⁸F]MPPF

Figure 41 : Radiochromatogramme du contrôle qualité du [^{18}F]MPPF

Figure 42 : Etude de la lianos non spécifique du [^{18}F]MPPF

Figure 43 : Détermination de la fixation totale du [^{18}F]BF227 aux fibrilles d' α -syn ou d'A β 1-42

Figure 44 : Détermination de la fixation spécifique du [^{18}F]BF227 aux fibrilles d' α -syn ou d'A β 1-42

Figure 45 : Molécules candidates comme radiotraceur de l' α -syn

Figure 46 : Principe de la technique de binding sur filtres par méthode de compétition

Figure 47 : Affinité du [^{18}F]MPPF pour les homogénats d'hippocampe de rat

Figure 48 : Coloration des agrégats d' α -syn par la Thioflavine S

Figure 49 : Fibrilles d'A β 1-42 et d' α -syn observées en MET

Figure 50 : Etude de binding du [^{18}F]BF227 sur fibrilles d' α -syn et d'A β 1-42

Figure 51 : Représentation des courbes de déplacement de la liaison du [^{18}F]BF227 aux fibrilles d' α -syn et d' A β 1-42 par le ZW31 et le F4SBIYB

Figure 52 : Schéma de la radiosynthèse du [^{11}C]DASB

Figure 53 : Contrôle qualité du [^{11}C]DASB

Figure 54 : Caractéristiques des souris étudiées en imagerie fonctionnelle

Figure 55 : Détection immunohistochimique de l' α -syn sous sa forme pathologique

Figure 56 : Imagerie TEP au [^{18}F]FDG

Figure 57 : Imagerie TEP au [^{18}F]MPPF

Figure 58 : Imagerie TEP au [^{11}C]DASB

Figure 59 : Dosage de la 5HT cérébrale et de son métabolite HIAA

Figure 60 : Hypothèses de projection

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques d'un radiotraceur des synucléinopathies idéal

Tableau II : Caractéristiques des potentiels radiotraceurs de l'alpha-synucléine

Tableau III : Récepteurs sérotoninergiques

Tableau IV : Résultats de l'évaluation de l'affinité des molécules candidates comme traceur de l' α -syn

TABLE DES ABBREVIATIONS

α -syn : alpha-synucléine

5HT : Sérotonine

HIAA : acide 5-hydroxy-indole-acétique

AA : Acide Aminé

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMS : Atrophie MultiSystématisée

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu

BUD : Bilan Uro Dynamique

CSP : Cysteine-String Protein

CT : Computed Tomography (Scanner)

DA : Dopamine

DCL : Démence à Corps de Lewy

Eau PPI : Eau Pour Préparations Injectables

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

HAS : Haute Autorité de Santé

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

ICBMS : Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires

IChe : Inhibiteurs de Choline Estérase

ICOMT : Inhibiteur de Catéchol-O-Méthyl Transférase

IMAO B : Inhibiteur de MonoAmine Oxydase B

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

L-DOPA : Lévodopa

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MA : Maladie d'Alzheimer

MP : Maladie de Parkinson

NAC : Non-Amyloid- β Component

PBS : Phosphate Buffer Saline

PcP : Personne *cum* Parkinson

PET : voir TEP

PFA : ParaFormAldéhyde

PLD : PhosphoLipase D

PLP2 : Phospho Lipase P2

PSL : Phospho Stimulated Luminescence

ROC : Receiver Operating Characteristic

ROI : Région d'Intérêt (Region Of Interest)

SNC : Système Nerveux Central

SPECT : voir TEMP

SUV: Standardized Uptake Value

SUVR : Standardized Uptake Value Ratio

TEP : Tomographie à Emission de Positons (PET en anglais)

TEMP : Tomographie d'Emission Mono-Photonique (SPECT en anglais)

TH : Tyrosine Hydroxylase

WT : Souche Sauvage (Wild Type)

INTRODUCTION

Les maladies neurodégénératives sont de nos jours un sujet de santé publique majeur ayant un impact économique et humain destiné à croître avec le vieillissement de la population [1]. La maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (AMS) font partie d'une famille de maladies neurodégénératives liées à l'accumulation pathologique d'une protéine : l' α -synucléine (α -syn), appelées les synucléinopathies [2]. Ces pathologies sont des maladies neurodégénératives progressives pour lesquelles il n'existe actuellement aucune méthode de diagnostic formel *pre-mortem*. À ce jour, la confirmation définitive de synucléinopathies n'est possible que sur des études *post-mortem* histopathologiques.

Le chevauchement clinique considérable des synucléinopathies nécessite de développer des biomarqueurs qui permettraient d'identifier les sujets «à risque», d'améliorer le diagnostic et d'effectuer une classification en sous-types de maladies au sein des synucléinopathies [3]. Ceci permettrait de mettre en place un suivi de la progression de la maladie dans le but d'optimiser les futurs traitements. Dans ce contexte, la Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une modalité d'imagerie utilisée en médecine nucléaire pour étudier la fonction et la neurochimie du cerveau humain [4]. La TEP permet une spécificité moléculaire et une sensibilité inégalées en imagerie. Plusieurs radiotraceurs TEP ont déjà été développés pour l'imagerie bêta-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (MA) [5, 6] mais il n'existe pas encore de biomarqueurs *in vivo* qui distinguent sans équivoque l'accumulation d' α -syn au niveau cérébral [7]. Certaines équipes ont réalisé des études dans

cette voie en synthétisant un composé : le BF227 (marqué au ^{11}C ou ^{18}F) qui présente une affinité pour l' α -syn [8, 9] .

De nombreux processus sont impliqués dans la physiopathologie des synucléinopathies. Le mécanisme de survenue de ces pathologies reste à l'heure actuelle incompris. L'exploration des systèmes de neurotransmission et des voies métaboliques pourraient permettre d'élucider ces mécanismes et pourraient constituer une aide précieuse pour développer de nouvelles thérapies.

Depuis longtemps, les modèles animaux nous aident à comprendre la physiologie et les mécanismes impliqués dans les maladies. Ils nous servent à évaluer, avant leur mise sur le marché, l'efficacité des traitements et les nouveaux outils d'imagerie. La souris est devenue l'un des principaux modèles animaux nécessaire à la compréhension des conséquences physiologiques de l'expression des gènes et de leur implication dans les maladies. Plusieurs modèles de souris transgéniques sur-exprimant l' α -syn de type sauvage (WT) ou mutée ont été développés. Parmi eux, des modèles *in vivo* peuvent être utilisés dans le développement d'agents d'imagerie de l' α -syn [10] .

Les travaux effectués au cours de cette thèse se positionnent dans une optique de développement d'un outil de diagnostic précoce des synucléinopathies et de compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces atteintes grâce à l'imagerie TEP.

Ces travaux s'articulent autour de trois études principales. Dans une première partie, le radiotraceur [^{18}F]BF227 sera évalué un modèle murin original de synucléinopathies. La

seconde partie sera consacrée à l'étude *in vitro* de l'affinité de douze molécules candidates comme radiotraceur des synucléinopathies. Enfin, la dernière partie traitera de l'étude de la neurotransmission sérotoninergique et du métabolisme glucidique sur le même modèle murin de synucléinopathies évoqué précédemment.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1

LES SYNUCLEINOPATHIES

1. Les synucléinopathies

1.1. L'alpha-synucléine

1.1.1. Généralités

L'alpha-synucléine (α -syn) est une protéine neuronale avec un poids moléculaire d'environ 14 kDa [11]. Elle appartient à la famille des protéines amyloïdes. La structure primaire de l' α -syn (Figure 1) correspond à sept répétitions imparfaites de séquences de 11 acides aminés (AA) avec la présence d'un motif redondant KTKEGV, prédictives de la formation de cinq hélices α amphiphiles dans la partie N-terminale [12, 13]. Une partie centrale (AAs 61-95) très hydrophobe, appelée NAC (non-amyloid- β component) est essentielle dans les phénomènes d'agrégation de la protéine et permet la formation des fibrilles amyloïdes [14, 15]. La partie C-terminale de l' α -syn (AAs 96-140) est caractérisée par la présence de résidus acides en quantité importante. Cette partie régule les procédés d'agrégation amyloïde et est localisée à la surface des fibrilles. Cette séquence est organisée en répétition de tandem de 16 AAs et constitue un site de liaison pour certains ions tels que Pb^{2+} , Cu^{2+} et d'autres cations [16]. Cette partie est relativement résistante à la protéolyse.

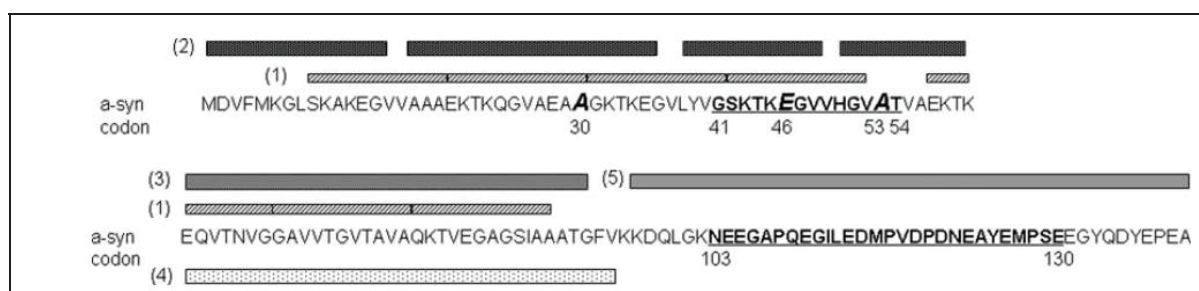


Figure 1: Structure de l'alpha-synucléine et domaines de prédilection[12].

La séquence primaire est constituée de sept répétitions imparfaites du motif KTKEGV (1). Les quatre premières hélices α (2) peuvent s'associer aux vésicules lipidiques et la cinquième hélice α (3) est responsable des interactions protéine-protéine. Une partie centrale dénommée NAC pour « non-amyloid- β component » (4) est retrouvée dans les plaques séniles et joue un rôle dans les phénomènes d'agrégation de la protéine. La partie C-terminale, dont la forme est non structurée, est riche en résidus acides et proline (5).

Le gène codant pour l' α -syn, appelé *SNCA* ou *PARK1*, est localisé au niveau du chromosome 4q21. Il comporte sept exons dont cinq sont traduits [17]. La taille des exons varie entre 42 et 1100 paires de bases. L'isoforme prédominante est constituée de 140 AA. Le second isoforme, l' α -syn 126 a subi une délétion de l'exon 3 (AAs 41-54) conduisant à la suppression de l'hélice α 3 et d'une partie de l'hélice α 4. L' α -syn 112 résulte d'une délétion de l'exon 5 [12]. Enfin, l' α -syn 98 a subi une délétion des exons 3 et 5 [18]. Ces trois dernières formes protéiques sont présentes en quantité plus importante dans la DCL et dans l'AMS [19].

Trois mutations génétiques ont été identifiées au niveau du gène *SNCA* et sont responsables de la modification de la séquence en AA de la protéine. Il s'agit des mutations A30P, A53T et E46K retrouvées dans les synucléinopathies [20-22]. De récentes études ont mis en évidence l'existence de nouvelles mutations G51D et H50Q [23-25]. Toutes ces mutations entraînent une modification de la séquence en AAs de la partie N-terminale de la protéine (Figure 1).

1.1.2. Localisation

Les premières études s'intéressant à la localisation de l' α -syn montrent que la protéine est présente majoritairement au niveau du cytosol des neurones du système nerveux central (SNC) et plus particulièrement au niveau des terminaisons pré-synaptiques [26, 27]. La localisation de la protéine évolue en fonction du temps. En effet, lors du développement, l' α -syn est présente au niveau du péricaryon contrairement à l'âge adulte où elle se retrouve dans les terminaisons nerveuses [28]. Certains auteurs décrivent la présence d' α -syn au niveau du noyau de la cellule [27, 29, 30] ; cette localisation pourrait être la conséquence d'un stimulus extérieur comme une situation de stress [31].

En 2007, Li *et al.* publient une étude décrivant la présence d' α -syn au sein de la mitochondrie [32]. Pour rappel, la mitochondrie est directement impliquée dans la survie et la mort neuronale.

Enfin, l' α -syn a été mise en évidence au niveau extra-cellulaire. Elle peut être sécrétée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) soit sous forme monomérique, soit sous forme agrégée [33, 34]. La protéine a également été détectée dans les lymphocytes et les plaquettes [35, 36] mais également dans d'autres tissus tels que les tissus oculaires notamment au niveau de la rétine [37].

1.1.3. Comportement conformationnel

1.1.3.1. Conformation physiologique

Dans son état physiologique, l' α -syn est majoritairement sous forme monomérique. Elle peut être dans une conformation de bobine dépliée ou sous une forme liée à la membrane vésiculaire [12, 13]. En présence des vésicules lipidiques, l' α -syn passe d'une conformation d'une structure aléatoire en serpent à une structure typique d'hélice α . Ce changement est attribué à la formation d'hélices α au niveau de la partie N-terminale [12]. Plus récemment, des équipes ont mis en évidence l'existence d'une forme stable tétramérique de l' α -syn [38, 39].

1.1.3.2. Conformation pathologique

Dans certaines conditions, l' α -syn peut adopter une conformation en feuillets β et former des agrégats insolubles (Figure 2). Ce phénomène d'agrégation débute par une phase de latence initiale, dite phase de nucléation, suivie par une phase de décroissance dite phase

d'élongation [40]. Durant la phase de nucléation, des monomères d' α -syn vont s'associer par les résidus hydrophobes de leur région centrale NAC pour former des intermédiaires, notamment dimères et trimères, qui eux-mêmes peuvent s'associer entre eux pour former des filaments solubles constitués d'oligomères d' α -syn. Ces différents intermédiaires obtenus après la phase de nucléation s'agrégeront ensuite pour former des filaments insolubles. Les filaments insolubles formeront des protofibrilles, puis des fibrilles et enfin des agrégats insolubles [13]. Les agrégats insolubles sont la signature des synucléinopathies.

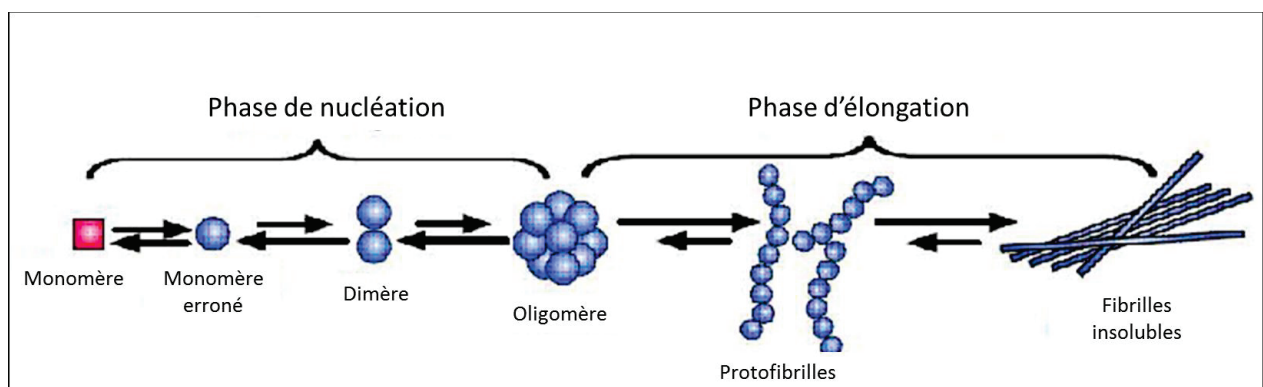


Figure 2 : Agrégation de l' α -syn [41].

Cependant, ces démonstrations ne sont qu'un schéma simplifié du phénomène d'agrégation. De récentes études ont mis en évidence un polymorphisme d'agrégation de l' α -syn. Ces différentes formes pourraient être impliquées dans diverses pathologies [42].

1.1.3.3. Facteurs favorisant le passage de l' α -syn sous une conformation pathologique

Les mutations génétiques de l' α -syn sont un facteur d'agrégation. Comme évoqué précédemment, cinq mutations du gène *SCNA* ont été identifiées [20-22] et sont caractéristiques des formes familiales de MP. Les α -syn mutées (A30P, A53T, E46K, G51D et H50Q) ont la capacité de former des fibrilles insolubles plus rapidement que la protéine

sauvage. L' α -syn A53T induit un stress au niveau du réticulum endoplasmique entraînant une élévation de l'activité caspase. L' α -syn A30P ne subit pas de modifications de la liaison aux vésicules lipidiques ni de changements de conformation des hélices α (contrairement à l'A53T) mais voit sa liaison aux liposomes diminuer. L' α -syn E46K possède une immense propension (supérieure à l' α -syn A53T et A30P) à former des agrégats et se lie fortement aux liposomes chargés. Les protéines α -syn G51D et H50K présentent des formes oligomériques présentant une toxicité plus importante [24, 43].

Les modifications post-traductionnelles jouent un rôle fondamental dans les phénomènes d'agrégation. Ces modifications peuvent affecter toutes les formes d' α -syn (sauvage, mutée, isoforme). La plus importante d'entre elles est la phosphorylation [12]. La sérine 129 est un site majeur de phosphorylation tout comme la sérine 87. Ces phénomènes de phosphorylation sont liés à l'action de protéines kinases C et A ainsi qu'aux caséines kinases CK-1 et CK-2. D'autres protéines, comme la protéine G couplée au récepteur kinase, interviennent dans ce phénomène. Dans 90 % des formes insolubles, l' α -syn est retrouvée sous forme phosphorylée au niveau du cerveau de patients atteints de DCL. Seulement 4% de la protéine est retrouvée sous forme phosphorylée chez des sujets sains ce qui suggère que la phosphorylation de l' α -syn serait un phénomène pathologique [44]. D'autres modifications post-traductionnelles comme la nitration, l'oxydation, l'ubiquitination, la sumoylation et la glycosylation jouent un rôle pathologique dans l'agrégation de l' α -syn [12]. Une surexpression de l' α -syn provoquée par l'existence de plusieurs copies du gène *SCNA* dans le génome entraîne une augmentation de l'expression de la protéine. Cette augmentation de concentration d' α -syn au niveau neuronal est responsable d'une augmentation de l'agrégation de la protéine [19].

L' α -syn peut être qualifiée de « protéine caméléon » : sa conformation s'adapte à l'environnement qui l'entoure [13]. Certaines conditions comme un pH acide, une température élevée, une concentration élevée de la protéine, une concentration particulière en sels et anions, la présence de vésicules, la présence de composés exogènes comme les solvants organiques, les pesticides et herbicides conduisent à une augmentation non seulement des structures secondaires de l' α -syn avec la formation d'hélices α mais également de feuillets β ainsi que des structures secondaires mal repliées. Ces structures sont responsables par la suite de la formation d'agrégats insolubles.

1.1.2. Fonctions

Le rôle de l' α -syn n'est pas clairement élucidé et la frontière entre fonction physiologique et fonction pathologique est mince. De nombreux facteurs interviennent dans le changement conformationnel de l' α -syn. Ces changements conformationnels sont à l'origine de l'apparition de phénomènes pathologiques complexes et en partie inexpliqués.

1.1.2.1. Fonctions physiologiques

Tout d'abord, l' α -syn intervient dans les fonctions de maintien synaptique. L' α -syn possède une forte affinité pour les phospholipides vésiculaires et elle peut se lier à ces derniers grâce à sa partie N-terminale qui adopte une conformation en hélice α . Cette association avec les structures vésiculaires permet à l' α -syn de réguler le turn-over vésiculaire au niveau synaptique [45]. Une interaction entre le réticulum endoplasmique et l' α -syn est responsable d'une régulation des fonctions de « trafficking » protéique [46]. Toujours dans ce rôle de maintien de la fonction synaptique, l' α -syn est promotrice de la formation des complexes SNARE (Soluble NSF Attachment protein Receptor) qui sont des

complexes protéiques qui catalysent la réaction de fusion des vésicules avec la membrane cible permettant aux vésicules synaptiques de relarguer leur contenu [47].

L' α -syn possède des propriétés de protéine chaperonne. En effet, la partie N-terminale de la protéine possède 40% de similitude avec la séquence des protéines chaperonnes 14-3-3 [48]. L' α -syn est donc capable d'interagir avec de nombreuses protéines. De ce fait, elle coopère avec la cystéine-string-protéine α (CSP) qui possède une fonction essentielle à la survie neuronale notamment dans la prévention des phénomènes neurodégénératifs [49].

Enfin, l' α -syn est impliquée dans la survie neuronale : elle joue un rôle dans la modulation de la structure des composés lipidiques des membranes et préserve leur intégrité [50]. Elle préviendrait également l'oxydation des lipides de la membrane neuronale, phénomène néfaste à la cellule [51]. Une fonction anti-apoptotique peut être prêtée à l' α -syn via une régulation de l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 [52].

1.1.2.2. Fonctions pathologiques

La phosphorylation de l' α -syn en quantité importante, la surexpression de la protéine et les phénomènes d'agrégation sont responsables de l'apparition d'une neurotoxicité.

Sous sa forme phosphorylée, l' α -syn peut se lier à la phospholipase D2 (PLP2) grâce à ses propriétés de protéine chaperonne. La PLP2 est une enzyme impliquée dans les phénomènes d'apprentissage continu, de mémorisation et de vieillissement. La fixation de l' α -syn sur cette enzyme inhibe les fonctions physiologiques de cette dernière [53].

L' α -syn possède également une importante affinité pour la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante dans la synthèse des catécholamines. Une surexpression de l' α -syn

entraîne une réduction considérable de l'activité TH, une phosphorylation de la TH et conduit à une réduction de la synthèse de dopamine (DA) [54].

Les oligomères d' α -syn possèdent une activité porine-like (comparable à certaines toxines bactériennes) capable de modifier la perméabilité de la membrane neuronale et d'altérer la cellule [55]. Sous sa forme agrégée, l' α -syn peut provoquer des modifications de l'homéostasie calcique et une perturbation des fonctions mitochondriales de la cellule conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial et à une toxicité. L' α -syn pathogène est également capable de perturber les fonctions lysosomales et notamment le phénomène d'autophagie [56]. Les oligomères d' α -syn peuvent se lier à la sous unité 20S du protéasome entraînant une inhibition de ce dernier. L'inhibition du protéasome a un impact sur les neurones dopaminergiques qui deviendraient plus sensibles au stress provoqué par les protéines dépliées [19]. De plus, en adoptant une conformation oligomérique, l' α -syn perd ses propriétés initiales neuroprotectrices décrites précédemment.

L' α -syn agrégée pourrait également promouvoir sa propre agrégation. L'hypothèse de propagation « prion-like » repose sur les propriétés d'endo- et d'exo-cytose de la protéine. Elle serait à même de provoquer un changement de conformation des formes physiologiques puis de se propager à l'extérieur de la cellule pour aller « contaminer » d'autres neurones [57-59].

1.2. Les synucléinopathies

L' α -syn est présente sous forme d'inclusions pathologiques dans la MP, la DCL et l'AMS. Ces trois pathologies sont communément appelées synucléinopathies.

1.2.1. Les pathologies à corps de Lewy

La MP et la DCL sont caractérisées par la présence de corps de Lewy et de neurites de Lewy (Figure 3). Les corps de Lewy sont des inclusions intracytoplasmiques, éosinophiles et le plus souvent sphériques. Leur cœur est cerné par un halo clair périphérique leur donnant un aspect caractéristique « en cocarde ». Ils sont constitués d'agrégats d' α -syn mis en évidence par des techniques d'immuno-analyses (emploi d'anticorps anti α -syn et tests ELISA,). Ils peuvent être marqués par des anticorps dirigés contre l'ubiquitine. Les neurites de Lewy sont des formations protéiques neuronales composées de filaments d' α -syn et de matériel granulaire. Ces marqueurs de synucléinopathies sont présents au niveau du tronc cérébral et du mésencéphale (substance noire, locus coeruleus, noyau moteur dorsal du nerf vague et noyau basal de Meynert) pour les patients atteints de MP tandis que ces structures sont prédominantes au niveau du cortex cingulaire, du gyrus para-hippocampique et de l'amygdale pour les patients atteints de DCL [57, 60].

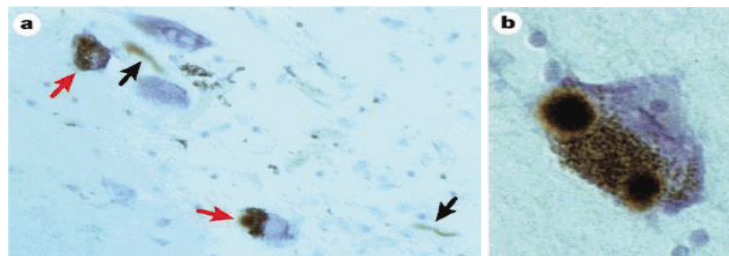


Figure 3 : Illustrations de corps de Lewy et de neurites de Lewy [61].

a. Deux cellules nerveuses pigmentées, contenant chacun un corps de Lewy (flèches rouges) et neurites de Lewy (flèches noires), échelle 20 μ m. b. Cellules nerveuses pigmentées avec deux corps de Lewy, échelle 8 μ m.

1.2.1.1. La maladie de Parkinson (MP)

L'HAS (Haute Autorité de Santé) définit la MP comme une maladie dégénérative de cause inconnue, touchant à la fois l'ensemble du système dopaminergique (atteinte de la voie nigrostriée à l'origine des symptômes cardinaux répondant au traitement substitutif dopaminergique) et des autres systèmes : cholinergique, noradrénergique et sérotoninergique (responsables des symptômes dopa-résistants et pouvant expliquer la variabilité des symptômes d'une PcP (Personne *cum* Parkinson) à l'autre) [62]. Cette dégénérescence a pour conséquence la mort neuronale par apoptose.

La MP est la cause la plus fréquente de syndrome parkinsonien, la seconde maladie neurodégénérative, après la MA et la seconde cause de handicap moteur d'origine neurologique chez le sujet âgé (après les accidents vasculaires cérébraux).

Sa prévalence est de l'ordre de 150 000 en France et son incidence d'environ 15/100000 habitants par an. Elle atteint également les deux sexes. L'âge moyen de début de la maladie se situe entre 44 ans et 66 ans. Le risque d'être atteint augmente avec l'âge mais 15% des parkinsoniens débutent leur maladie avant l'âge de 40 ans (début précoce) voire avant 20 ans (juvénile).

Le diagnostic de certitude de la MP est histologique et ne peut se faire du vivant du patient. Le diagnostic actuel repose sur des données purement cliniques, même si différentes techniques, en particulier d'imagerie médicale, commencent à améliorer sa fiabilité et sa probabilité.

Sur le plan clinique, la MP est caractérisée par une triade de signes cardinaux à savoir tremblements de repos, bradykinésie et rigidité. Ces symptômes sont accompagnés d'une asymétrie, de l'absence de signes atypiques et d'une réponse à la lévodopa (L-DOPA).

D'autres signes comme une hypotension, des troubles urinaires, des troubles digestifs, des troubles thymiques et cognitifs, des troubles du sommeil et des douleurs peuvent être présents [62].

Le diagnostic de la MP repose donc sur l'existence de signes cliniques. Des examens complémentaires peuvent être réalisés :

- soit pour éliminer d'autres étiologies : la réalisation d'un bilan urodynamique (BUD) est une aide au diagnostic différentiel entre la MP et l'AMS (les patients atteints de ces pathologies peuvent présenter des troubles urinaires mais les résultats du BUD diffèrent). Des tests neuropsychologiques à la recherche d'anomalies fréquentes permettent de mettre en évidence d'autres syndromes parkinsoniens dégénératifs ;
- soit pour objectiver l'existence d'un syndrome démentiel lors de l'évolution de la maladie.

Il n'existe pas actuellement de traitement curatif de la MP. En l'absence de retentissement moteur, les traitements médicamenteux antiparkinsoniens ne sont pas indispensables. D'autres traitements peuvent s'avérer nécessaires dès la phase initiale : antalgiques, anxiolytiques, antidépresseurs, anti-hypotenseurs. Pour les patients nécessitant un traitement symptomatique, l'âge de début et l'importance de la gêne fonctionnelle sont les deux facteurs qui guident les choix thérapeutiques. Le début du traitement par L-Dopa sera retardé au maximum du fait de l'apparition secondaire de complications motrices liées à ce traitement : fluctuations, dyskinésies. Le traitement médicamenteux des troubles moteurs au début de la MP est décrit dans la Figure 4.

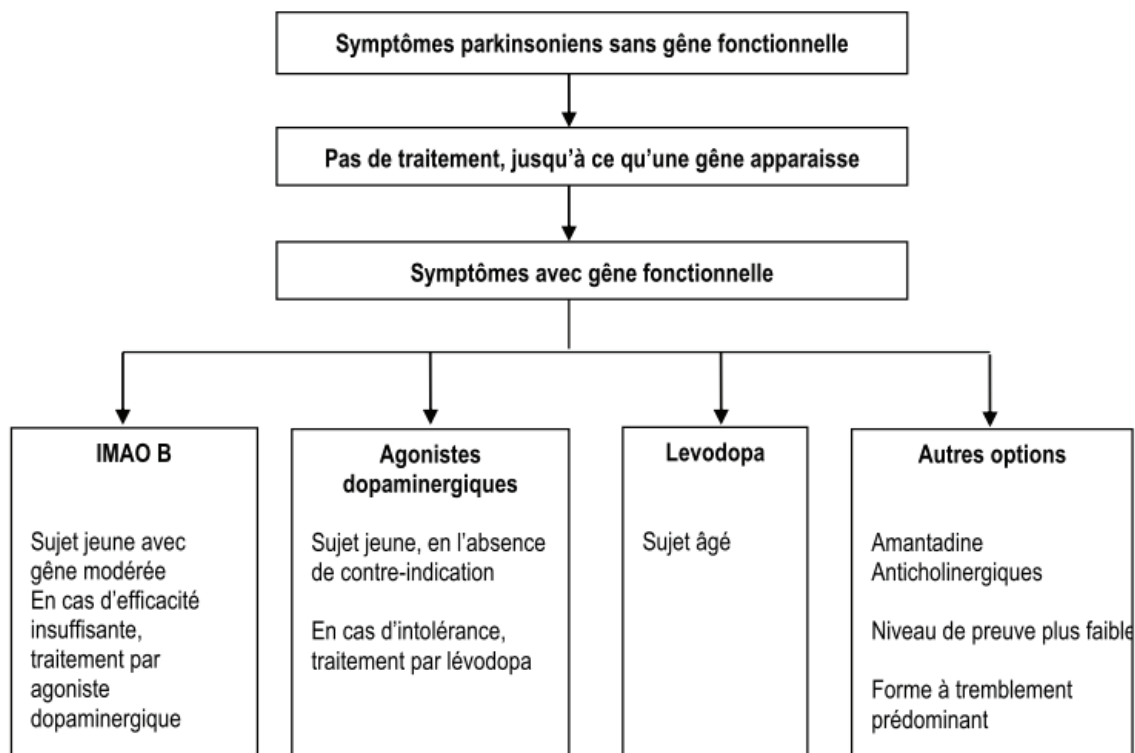


Figure 4 : Traitement médicamenteux des troubles moteurs au début de la MP [62].

Après une période de stabilisation (phase d'état) par L-DOPA plus ou moins longue, la situation clinique des patients s'aggrave du fait de la survenue de complications motrices liées au traitement (fluctuations motrices, effets on/off, dyskinésies) et de l'apparition ou de l'aggravation de signes propres à la MP non dopa-dépendants (liés au caractère diffus de la maladie touchant d'autres systèmes que le système dopaminergique). Le traitement des complications motrices liées au traitement dopaminergique est un perpétuel ajustement des doses et des horaires de prise en fonction de chaque cas et des variations de l'état moteur du patient au fil des mois. Il faut également tenir compte, dans ces réajustements, des signes non-moteurs de la maladie, notamment des fluctuations thymiques, des troubles du comportement liés au traitement, de la fatigue, des troubles sensoriels et douloureux. Les complications motrices pouvant survenir sont :

- les fluctuations motrices : réapparition de la symptomatologie parkinsonienne au cours du nycthémère. Elles sont annoncées par l'apparition d'une akinésie du réveil et d'une akinésie de fin de dose ; elles deviennent ensuite plus soudaines, plus intenses et imprévisibles (phénomènes on/off).
- les blocages moteurs, « freezing » de la marche.
- les dystonies : le plus souvent douloureuses, touchant de façon préférentielle les membres inférieurs, se limitant le plus souvent aux orteils ou aux pieds, mais pouvant aussi être plus étendues.

La stratégie thérapeutique à ce stade de la maladie est décrite dans la Figure 5.

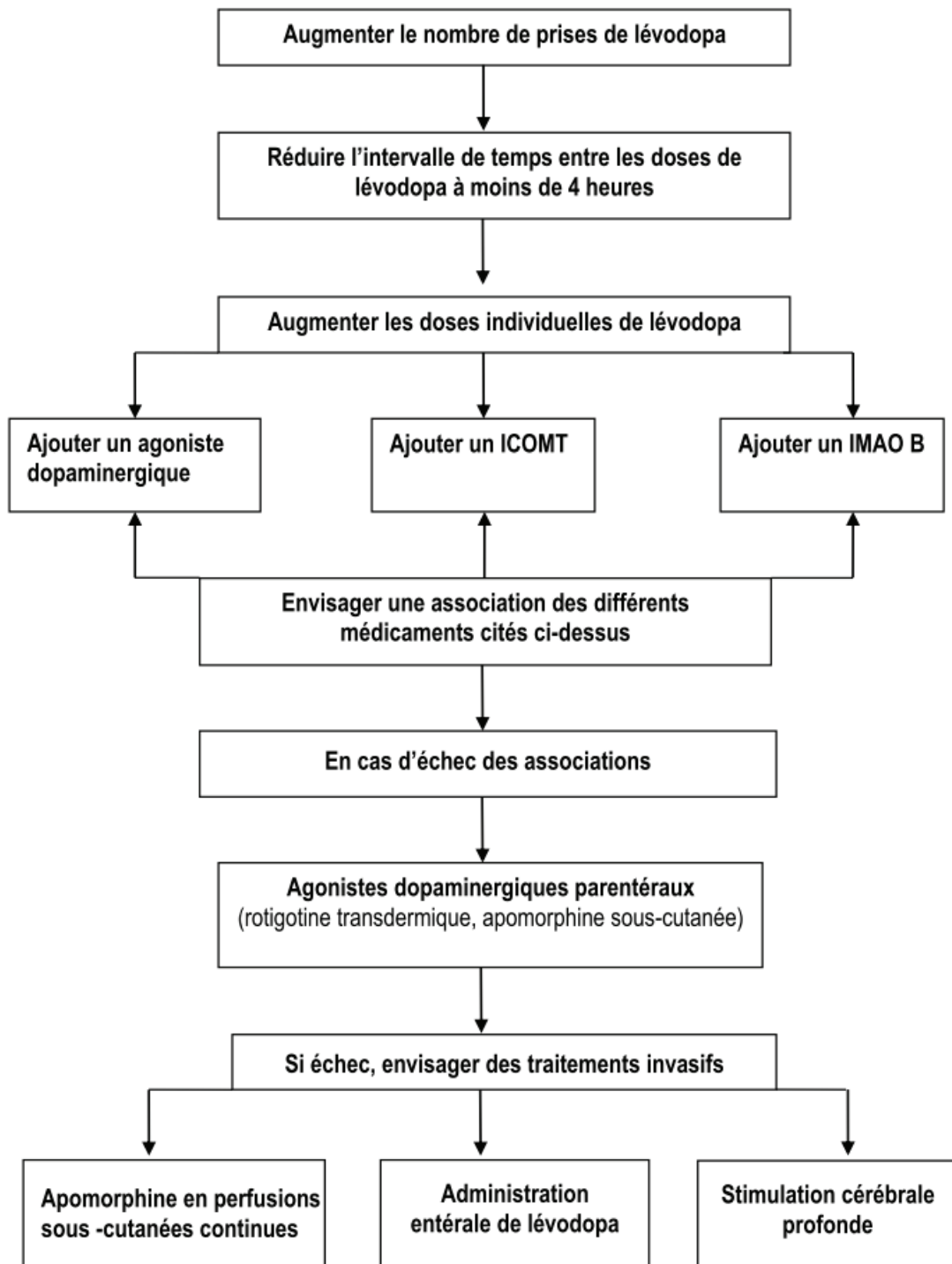


Figure 5: Traitement médicamenteux des troubles moteurs au stade avancé [62].

1.2.1.2. La démence à corps de Lewy (DCL)

La DCL représente 3,6 à 6,6 % des démences chez les sujets de plus de 65 ans. Elle représente la deuxième cause de démence après la MA. Les symptômes de la DCL débutent avec l'apparition de troubles cognitifs et psychiatriques. Les éléments caractéristiques de cette pathologie sont une fluctuation cognitive (et plus spécialement des fonctions de l'attention), des hallucinations visuelles et un syndrome parkinsonien [63]. Le diagnostic de DCL repose sur les critères de Mc Keith [64]. Il existe également des critères suggestifs comme des troubles du sommeil paradoxal, une hypersensibilité aux neuroleptiques qui, associés à au moins des critères principaux, peuvent permettre le diagnostic de DCL (Figure 6).

La démence à corps de Lewy: Critère du diagnostic clinique ¹²
Caractéristiques principales <ul style="list-style-type: none">• La fonction cognitive progressive perd de l'importance pour ainsi intervenir au niveau de la fonction professionnelle et sociale.• Les troubles de la mémoire prononcés ou rémanents ne se manifestent pas nécessairement dans les premiers stades, mais il est évident qu'ils progressent dans la plupart des cas.• À l'examen, on constate que les pertes d'attention, l'aptitude de portion frontale et sous-corticale, et l'habileté visuelle spatiale sont très prononcées.
Caractéristiques essentielles <ul style="list-style-type: none">• Fluctuations cognitives avec variations prononcées de l'attention et de la vigilance• Hallucinations visuelles récurrentes généralement bien formées et détaillées.• Caractéristiques motrices spontanées du syndrome parkinsonien.
Caractéristiques de soutien <ul style="list-style-type: none">• Chutes fréquentes• Syncope• Évanouissements transitoires• Délires systématisés• Hallucinations dans d'autres modalités• Trouble du comportement en sommeil paradoxal (<i>REM sleep</i>)• Dépression
Caractéristiques moins fréquentes <ul style="list-style-type: none">• Antécédents de crises• Signes de maladie physique ou tout autre trouble cérébral pour intervenir au niveau de la performance cognitive.

Figure 6 : Critères de diagnostic cliniques de la DCL [64].

La réalisation d'un diagnostic différentiel de DCL s'avère difficile car la classification des démences est complexe et le recouvrement des pathologies est très important. Un dosage du peptide β -amyloïde et de la protéine Tau dans le LCR permet d'éliminer une MA [64]. La réalisation d'un électroencéphalogramme permet d'observer un rythme plus lent initial chez les patients atteints de DCL à la différence des patients atteints de MA et de démence parkinsonienne [28]. Le dosage de la protéine 14.3.3 dans le LCR est une aide au diagnostic différentiel de la maladie de Creutzfeldt Jacob [65]. Actuellement, le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence des corps de Lewy *post-mortem* au niveau cérébral.

L'arsenal thérapeutique dont disposent les cliniciens pour prendre en charge les patients atteints de DCL est très pauvre. Le traitement par agents cholinergiques serait avantageux pour les patients qui présentent d'importants déficits cholinergiques au niveau du cortex, du tronc cérébral, des noyaux du cerveau antérieur basal ainsi que dans les récepteurs post-synaptiques, corticaux et muscariniques. En effet, un essai sur les inhibiteurs de cholinestérase (IchE) : le donépézil, la rivastigmine et la galantamine, a prouvé un bienfait clinique dans les domaines cognitifs et du comportement [66-69]. Une autre étude clinique sur la rivastigmine a montré que la molécule diminuait de façon significative les symptômes psychiatriques essentiels de la DCL (l'apathie, l'anxiété, les délires et les hallucinations) [70]. De plus, la rivastigmine produit un effet bénéfique sur les fluctuations de l'attention. Aucune aggravation des symptômes moteurs n'a été constatée et l'innocuité et la tolérance ont été considérées comme favorables. Les IchE sont considérés comme le traitement de première intention pour les symptômes cognitifs et psychiatriques de la DCL, en dépit des preuves limitées. Concernant les symptômes moteurs, l'efficacité de la L-DOPA n'a pas été encore déterminée. La L-DOPA peut aggraver les hallucinations. Le clonazépam et la mélatonine

peuvent être prescrits dans le traitement des troubles du comportement en sommeil paradoxal [71].

La composante psychotique ne doit pas être traitée par des neuroleptiques car ces molécules sont mal tolérées. La clozapine peut cependant être utilisée en cas de troubles psychotiques majeurs [72].

1.2.2. L'atrophie multisystématisée (AMS)

L'atrophie multisystématisée est caractérisée par la présence d'inclusions intracytoplasmiques oligodendrogiales (Figure 7) composées majoritairement de filaments d' α -syn comparables à ceux présents dans les corps et neurites de Lewy [73]. Ces inclusions possèdent une forte propension à se lier à l'argent. Elles peuvent ainsi être mis en évidence grâce à la méthode de Gallyas. Elles présentent un résultat positif aux tests immunochimiques à l'ubiquitine et à la p62. Les inclusions sont présentes au niveau pyramidal, extrapyramidal et au niveau du système autonome cortico-cérébelleux et pré-ganglionnaire [74].

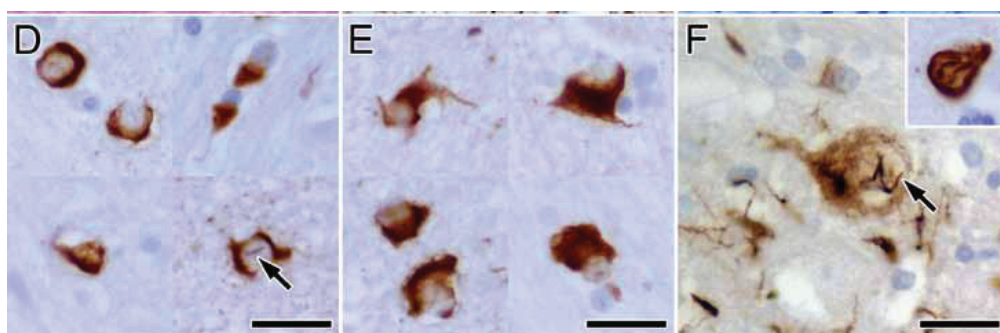


Figure 7 : Images microscopiques d'atrophie multisystématisée (échelle 20 μ m) ; D-E : Inclusions oligodendrogiales positives à l' α -syn, F : Inclusions neuronales d' α -syn [74].

L'AMS est une pathologie débutant à l'âge adulte, caractérisée par un syndrome parkinsonien (lenteur, rigidité, tremblement), une ataxie (déséquilibre, maladresse), des

problèmes de régulation de la pression artérielle (hypotension orthostatique) ou du système urinaire et génital (troubles de l'érection). N'importe quelle combinaison de ces symptômes est possible. La prévalence est estimée de 1/50 000 à 1/10 000 et s'accroît avec l'âge. Ces chiffres sont sous-estimés en raison de la difficulté à établir un diagnostic. Cette pathologie atteint légèrement plus d'hommes que de femmes, quelle que soit leur origine géographique. Cette différence s'explique peut-être par le fait que les hommes consultent plus facilement en début de maladie, en raison des troubles de l'érection. La maladie survient pour la majorité des cas entre 50 et 70 ans (mais peut apparaître dès 30 ans et jusqu'à 80 ans). Les symptômes cliniques sont très variables d'un patient à l'autre. Les troubles urinaires, l'impuissance, et les problèmes de pression artérielle (liés à l'atteinte du système nerveux autonome) constituent fréquemment les premiers signes de la maladie et peuvent être très invalidants. Par la suite, les signes évoquant une MP, tels que la rigidité, la lenteur des mouvements, l'apparition d'un tremblement, sont généralement au premier plan. Ils concernent 90 % des patients atteints. L'incoordination motrice, les troubles de l'équilibre et de la marche (signes dits « cérébelleux »), sont quant à eux observés chez la moitié des patients, mais sont moins fréquemment présents au début de la maladie. Lors de l'évolution de la maladie, l'ensemble des symptômes apparaît de façon plus ou moins marquée. Fatigue et faiblesse générale sont quasiment systématiques. Au cours de l'AMS, certaines manifestations peuvent prédominer. On parle d'AMS de forme P (parkinsonienne), appelée autrefois dégénérescence striatonigrique, quand les signes parkinsoniens initient et dominant la maladie (80 % des cas), et d'AMS de forme C (cérébelleuse), anciennement appelée atrophie olivopontocérébelleuse, quand les signes cérébelleux prédominent (20% des cas). Enfin, quand ce sont les troubles urinaires ou de tension qui sont les plus importants, c'est le terme de « syndrome de Shy-Drager » qui est parfois employé [75].

Cette affection réduit l'espérance de vie : après le début de la maladie, la survie est d'environ 10 ans. Les problèmes de respiration (stridor, pneumonies liées à des fausses routes) ou les arrêts cardiaques (mort subite) sont les causes fréquentes de décès [76].

Le diagnostic de cette pathologie est clinique et il est l'objet de confusion avec la MP [74]. La dysautonomie est plus marquée et plus précoce chez les patients atteints d'AMS. L'imagerie cérébrale présente des signes inconstants et tardifs comme une atrophie cérébelleuse et mésencéphalique ainsi que des anomalies putaminales (hypo-intensité en T1 avec une hyper-intensité en T2 à l'IRM) qui ne sont pas retrouvés dans la MP [63]. Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence *post-mortem* des inclusions oligodendrogiales au niveau cérébral.

Comme pour toutes les synucléinopathies, il n'existe pas de traitement curatif. Certains médicaments peuvent toutefois atténuer les symptômes, et une prise en charge non médicamenteuse doit être mise en place. Un traitement peut notamment être instauré pour lutter contre les troubles moteurs et l'hypotension orthostatique, ainsi que contre l'incontinence urinaire, la constipation et les troubles de l'érection. Les médicaments utilisés dans la MP ont une efficacité (souvent partielle) chez environ un tiers des patients au début de la maladie, mais de façon transitoire et à des doses plus élevées que dans la MP. Chez ces patients, un tel traitement permet de diminuer un peu l'akinésie et la rigidité. Il est souvent entrepris à titre d'essai et à forte dose. La fludrocortisone (Flucortac®) ou la midodrine (Gutron®) peuvent être utilisées pour corriger l'hypotension orthostatique. Ces traitements sont parfois responsables d'une élévation excessive de la tension artérielle au coucher (et la nuit), ce qui peut nécessiter la prise d'un traitement antihypertenseur nocturne. Par ailleurs, ils doivent être accompagnés de mesures non médicamenteuses (bas de contention, élévation de la tête du lit, se lever lentement, éviter de rester allongé trop longtemps...). Les

troubles urinaires peuvent être traités par des anticholinergiques ou des alpha-bloquants. Ils ne sont prescrits généralement qu'après un BUD précis. Le but du traitement est d'éviter au maximum la stagnation des urines dans la vessie et donc le risque d'infection. Parfois, un sondage urinaire peut être nécessaire de manière intermittente ou permanente. L'altération de la fonction respiratoire doit être prévenue par une bonne prise en charge des troubles de la déglutition. En effet, les fausses routes à répétition peuvent entraîner des infections respiratoires. Une gastrostomie peut parfois être proposée au patient. Afin de réduire les complications cardiovasculaires et pulmonaires dues à l'apnée du sommeil et/ou du stridor, l'utilisation d'appareils de ventilation peut être recommandée durant la nuit. Dans certains cas de gêne respiratoire intense, une trachéotomie peut être proposée.

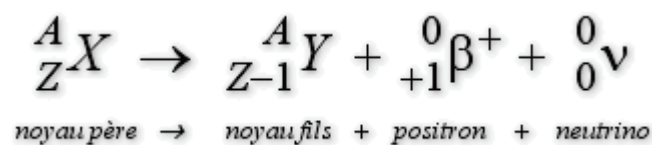
En résumé, toutes les synucléinopathies sont des pathologies complexes. Les symptômes cliniques se recouvrent, ce qui ajoute une difficulté supplémentaire à l'établissement du diagnostic. L'arsenal thérapeutique pour traiter ces pathologies est pauvre et il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement curatif. La prise en charge non médicamenteuse des patients atteints est indispensable. Il faut d'adapter l'environnement et l'habitat du patient. Au cours de l'évolution de la pathologie, il faut insister sur l'importance de la stimulation cognitive, de la kinésithérapie et des thérapies comportementales. Il faut sans cesse s'assurer de l'absence d'iatrogénie médicamenteuse et lutter contre tout facteur qui peut entraîner une confusion et perturber le comportement (fécalome, rétention d'urine, infection...). L'information aux familles et aux proches est essentielle pour que tous comprennent la pathologie et que l'accompagnement du patient se déroule le plus sereinement possible.

1.3. L'imagerie des synucléinopathies

Les deux principales modalités d'imagerie moléculaire et fonctionnelle sont la TEP (Tomographie par Emission de Positons) et la TEMP (Tomographie par Emission Mono-Photonique). Ces deux techniques sont basées sur l'injection de radiotraceurs respectivement émetteurs β^+ et γ . Elles présentent des résolutions similaires (de l'ordre du mm) mais la TEP présente une sensibilité supérieure. C'est une des raisons pour laquelle nos travaux porteront sur la recherche d'un radiotraceur TEP.

1.3.1. Principe de la TEP

La TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle et moléculaire permettant de suivre les processus physiologiques et biochimiques *in vivo* à l'aide d'émetteurs de positons à demi-vie courte. Les émetteurs de positons sont des éléments caractérisés par un excès de charge positive dans leur noyau. Ils se désintègrent vers un état stable par la transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un positon et d'un neutrino. Cette désintégration radioactive correspond à l'émission d'un rayonnement β^+ .



Une fois émis, le positon parcourt quelques millimètres dans les tissus avant d'interagir avec un électron du milieu. Le phénomène d'annihilation du β^+ avec l'électron conduit à l'émission simultanée de deux photons gamma (photons d'annihilation) de 511 KeV émis à 180° environ. Cette propriété est exploitée pour localiser la position d'émission des photons d'annihilation. La caméra TEP équipée d'une couronne de détecteurs (cristaux scintillateurs)

couplée à des photomultiplicateurs permet de récupérer et d'amplifier un signal électrique (Figure 8). Un traitement du signal complexe permet par la suite de reconstruire des images [77].

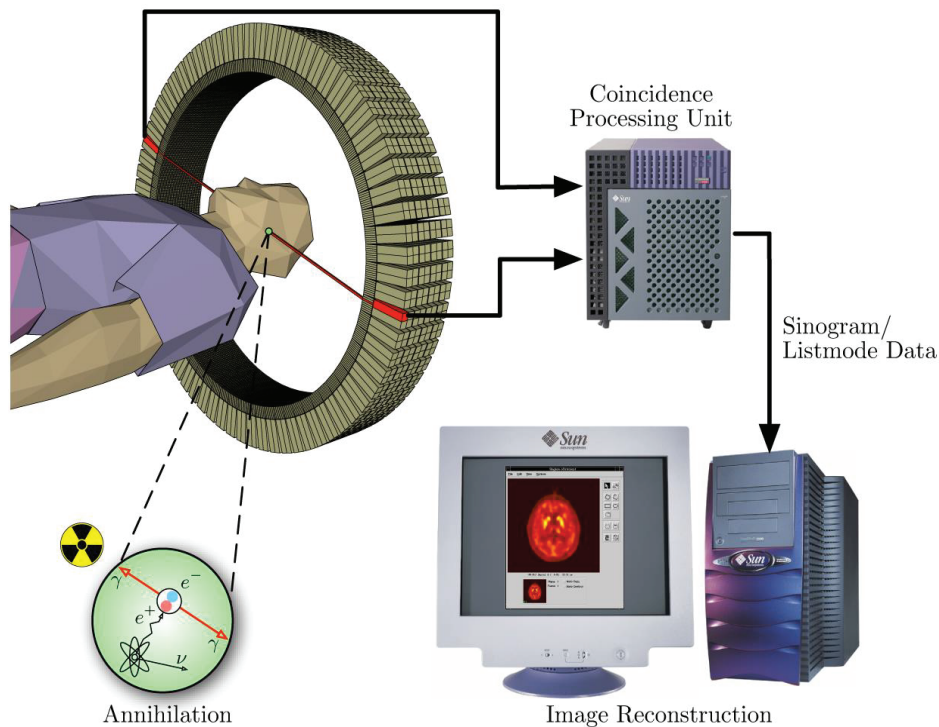


Figure 8 : Principe d'une caméra TEP. Source : <http://jens-maus.de/ftp/MScThesis.bib>

Les principaux radioéléments émetteurs β^+ utilisés en TEP sont le ^{11}C , le ^{13}N , le ^{15}O et surtout le ^{18}F . Le ^{18}F présente l'avantage par rapport aux autres d'avoir le plus faible parcours de positon dans la matière (0,6 mm). Sa période de 110 minutes (la plus longue des quatre émetteurs β^+) est également très intéressante. En clinique, le [^{18}F]Fluorodesoxyglucose ([^{18}F]FDG), analogue du glucose, est le radiotraceur le plus utilisé.

Les caméras TEP peuvent être couplées à des techniques d'imageries anatomiques comme le scanner à rayons X (TEP scan ou PET/CT (Positron Emission Tomography/Computed Tomography)) ou à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) dans le but d'effectuer un repérage anatomique des anomalies révélées par la TEP. Actuellement, les deux modalités

d'imagerie par IRM et TEP sont réalisées séparément. La première IRM-TEP simultanée de France, une Siemens Biograph® mMR, est actuellement en cours d'installation au CERMEP. L'installation consiste en une plateforme d'imagerie innovante composée d'un système hybride TEP-IRM pour l'exploration structurelle et fonctionnelle du vivant de manière simultanée. Il ouvrira ainsi des voies innovantes d'étude des fonctions cérébrales, de la physiopathologie des cancers, des dysfonctionnements cardiovasculaires, et des désordres nutritionnels et métaboliques.

1.3.2. Pourquoi développer un radiotraceur des synucléinopathies ?

Comme évoqué précédemment, le diagnostic *in vivo* des synucléinopathies repose sur l'évaluation des critères cliniques. Le diagnostic de certitude est établi *post-mortem*. Il existe clairement un besoin urgent de développer un biomarqueur pour les synucléinopathies qui permettrait un diagnostic précoce de la maladie et une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques. Ceci apporterait de nouvelles pistes pour développer des traitements curatifs. De plus, ce diagnostic de certitude permettrait de rétablir une classification exacte des patients dans les essais cliniques [7, 78].

1.3.2.1. L'imagerie actuelle des synucléinopathies

Actuellement, l'arsenal disponible en imagerie constitue uniquement une aide au diagnostic des synucléinopathies. Les images obtenues peuvent permettre d'effectuer un diagnostic différentiel mais en aucun cas de poser un diagnostic de certitude. Ces techniques ont souvent été testées chez un petit nombre de patients et la classification entre les groupes malades et les groupes contrôles est incertaine.

NB : Les techniques d'imagerie comme l'IRM et l'échographie ne seront pas abordées dans cet exposé.

1.3.2.1.1. Les traceurs TEMP

Le [^{123}I]FP-CIT (DaTScan[®]) est un radiotracteur permettant de visualiser les transporteurs de la DA et donc de mettre en évidence un déficit de la neurotransmission dopaminergique au niveau du striatum. Cet examen scintigraphique est une aide pour effectuer un diagnostic différentiel entre DCL et MA chez des patients déments. Chez les patients atteints de DCL, on observe une sévère dégénérescence de la voie nigrostriée et une diminution de la fixation synaptique du traceur contrairement aux patients atteints de MA [79, 80]. Cet examen ne permet pas de distinguer une démence parkinsonienne d'une DCL (Figure 9).

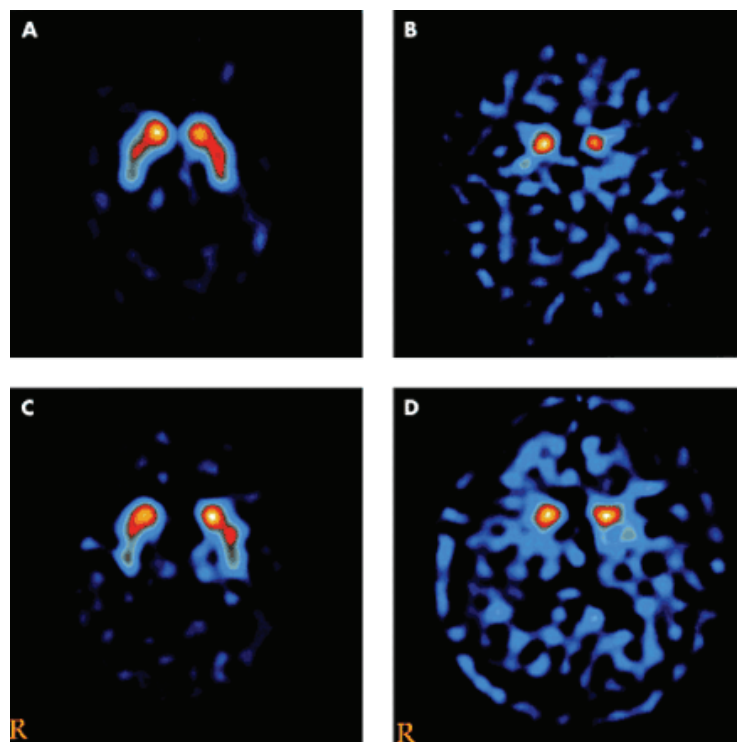


Figure 9 : Images SPECT après injection de [^{123}I]FP-CIT à un sujet contrôle (A), à un patient atteint de MP (B), de MA (C) et de DCL (D) [79].

Les différences de débit sanguin cérébral régional visualisées en scintigraphie au [^{99m}Tc]HMPAO (Ceretec[®]) ont été étudiées dans la MP, la DCL et la MA. La perte du signal du [^{99m}Tc]HMPAO est observée dans les régions frontales et pariéto-temporales chez les patients atteints de MA. En revanche, dans la DCL, on observe une diminution bilatérale de la fixation dans toutes les régions corticales sauf dans les régions postérieures frontales et occipitales. On observe également une hypoperfusion dans toutes les régions frontales, dans la région temporo-insulaire gauche, dans la région temporo-pariétale droite et dans les régions pariétales. Ces anomalies sont absentes chez les patients atteints de MP [81].

Un dysfonctionnement autonome cardiovasculaire est particulièrement fréquent dans la DCL et peut également être présent dans la MP pré-motrice. La scintigraphie cardiaque au [^{123}I]MIBG (analogue de la noradrénaline) est une technique d'imagerie explorant la fonction adrénergique présynaptique. La réalisation de cet examen chez des patients atteints de MP a montré une réduction de fixation cardiaque comparée à la fixation médiastinale, phénomène non observé chez des patients atteints de MA et chez les sujets sains (Figure 10). De plus, les résultats d'une méta-analyse ont montré que la scintigraphie au MIBG possède une sensibilité de 89% pour diagnostiquer une MP et une spécificité de 77% pour discriminer la MP et l'AMS. L'aire sous la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) est estimée à 0,93 avec un IC à 95% de [0,90-0,95] [82]. Il faut cependant nuancer ces résultats car l'interprétation de ces images n'est pas aisée et d'autres affections non neurologiques, comme le diabète ou l'infarctus du myocarde, peuvent modifier les résultats.

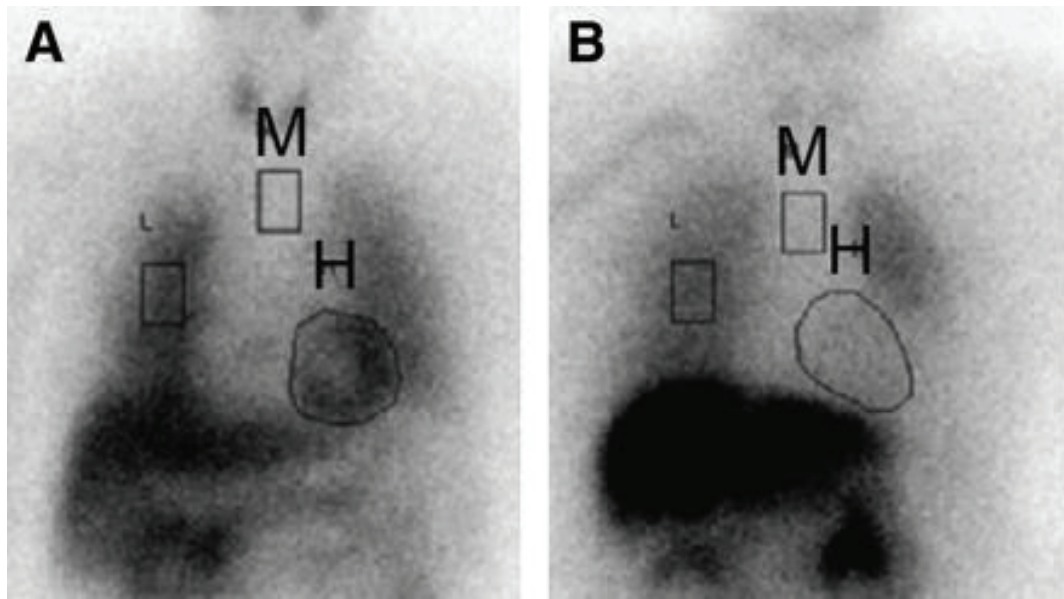


Figure 10 : Images scintigraphiques précoces réalisées au $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ chez un sujet sain (A) et chez un sujet atteint de MP (B) [83].

Sur le plan expérimental, d'autres traceurs TEMP ont été développés. La DCL est connue pour être associée à un déficit cholinergique marqué avec une diminution du taux d'acétylcholine transférase, enzyme responsable de la synthèse d'acétylcholine. L'utilisation de $[^{123}\text{I}]\text{-5IA-85380}$, radiotracer se fixant aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine $\alpha 4\beta 2$, a montré une réduction de fixation bilatérale de ce composé au niveau du striatum, dans la région temporale supérieure gauche, dans la région frontale inférieure droite et au niveau du gyrus cingulaire chez des patients atteints de DCL versus contrôles [38]. L'injection d'un autre traceur, le $[^{123}\text{I}]\text{-QNB}$, se fixant sur les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine, montre une augmentation de ces récepteurs au niveau du gyrus occipital droit et au niveau du gyrus lingual droit chez des patients atteints de DCL versus contrôles [39].

1.3.2.1.2. Les traceurs TEP

En clinique, la [^{18}F]Fluoro-DOPA ([^{18}F]F-DOPA) est un radiotraceur qui permet la mise en évidence d'une neurodégénération de la voie nigrostriée. Cet examen permet d'effectuer un diagnostic différentiel de la MP des autres pathologies avec une grande sensibilité et une grande spécificité (supérieures à 90%) [7]. Une étude montre que la [^{18}F]F-DOPA peut être employée dans le suivi de la MP (Figure 11). En effet, les auteurs ont observé que la fixation de la [^{18}F]F-DOPA diminuait sensiblement chez les patients parkinsoniens sur une période de 5 ans (*versus* population contrôle) [84].

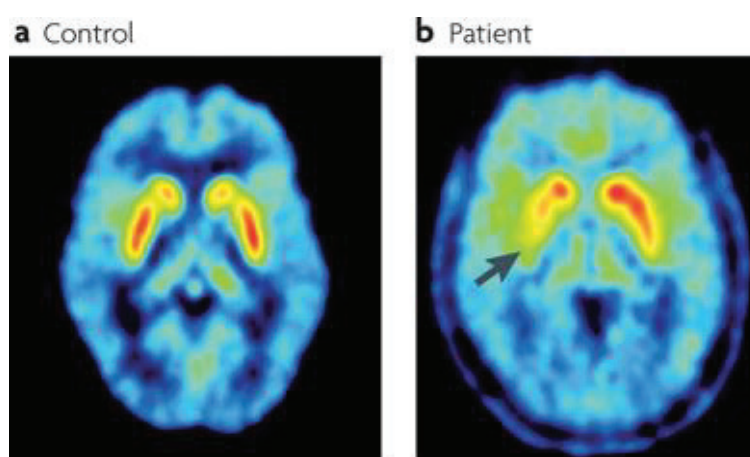


Figure 11: Images TEP obtenus après injection de [^{18}F]F-DOPA chez un sujet sain (a) et chez un patient atteint de MP (b) [85].

L'absorption du traceur est nettement réduite dans le putamen postérieur gauche (l'absorption dans la zone indiquée par la flèche est de 70% inférieure à la normale) et, dans une moindre mesure, dans le putamen-caudé antérieur et dans l'hémisphère gauche.

Afin de différencier la MA des autres démences, des traceurs TEP de la plaque amyloïde ont vu le jour. Le premier composé décrit dans la littérature est le [^{11}C]PIB (Pittsburgh Compound-B marqué au ^{11}C). La fixation globale corticale du [^{11}C]PIB est plus faible chez les patients atteints de DCL que chez les patients atteints de MA mais néanmoins plus élevée que chez des sujets sains [86]. Du fait de son radiomarquage au ^{11}C et donc de sa période de 20 minutes, le composé PIB ne pourra jamais être commercialisé. De nouveaux

traceurs de plaques amyloïdes marqués au ^{18}F ont vu le jour récemment. Il s'agit du ^{18}F florbetapir (ou ^{18}F AV45), du ^{18}F florbetaben (ou ^{18}F BAY94-9172) et du ^{18}F flutemetamol [5] (Figure 12).

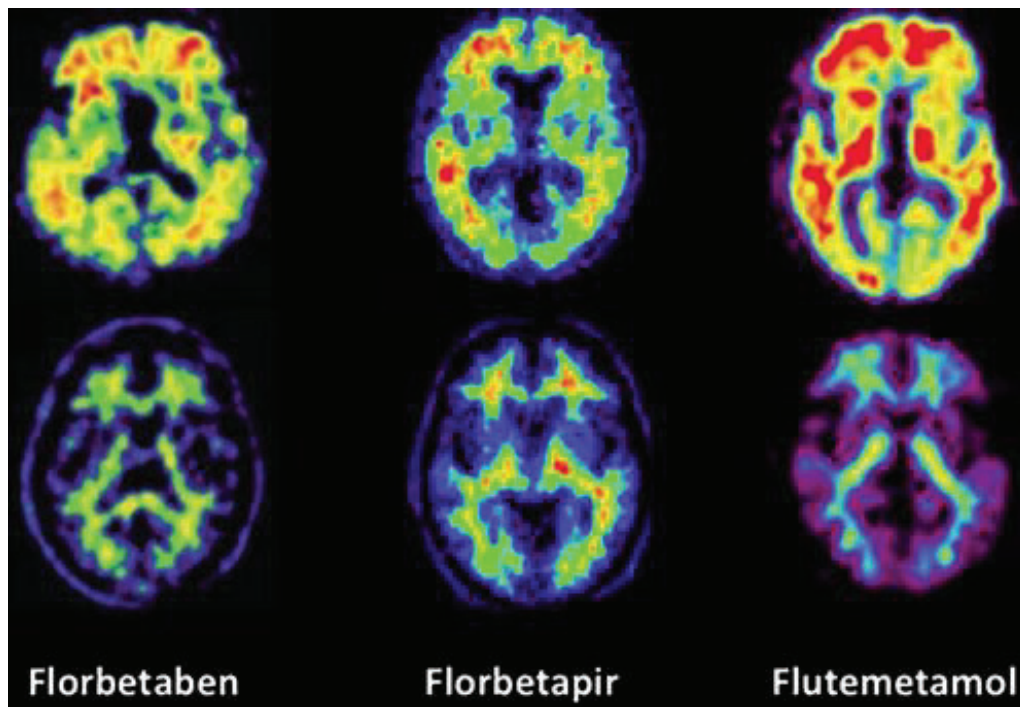


Figure 12 : Visualisation de la charge amyloïde par des agents d'imagerie TEP de la plaque amyloïde : le ^{18}F florbetaben, le ^{18}F florbetapir et le ^{18}F flutemetamol chez des sujets atteints de MA (en haut) et chez des sujets sains (en bas) [5].

Le ^{18}F AV45 a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2012 et est commercialisé sous le nom d'Amyvid®. Cependant, en 2013, l'HAS publie un rapport évoquant une ASMR (Amélioration du Service Médical Rendu) insuffisante concernant l'utilisation du produit.

D'autres radiotraceurs de la MA sont également en cours de développement. Leur cible est la protéine Tau, présente en abondance dans les neurodégénérescences fibrillaires

sous sa forme phosphorylée [87]. Avec les dépôts amyloïdes, ces neurodégénérescences constituent la signature moléculaire de la MA.

1.3.2.2. L'alpha-synucléine, une cible pour un biomarqueur

Les agrégats insolubles d' α -syn sont la signature des synucléinopathies. Développer un marqueur capable de mettre en évidence ces agrégats permettrait d'établir un diagnostic direct et spécifique de ces pathologies *ante-mortem* et d'étudier leur évolution dans un but de compréhension des mécanismes physiopathologiques et de développement de thérapies.

1.3.2.2.1. Les limites du dosage biologique de l'alpha-synucléine

Le dosage de l' α -syn a été testé dans différents liquides biologiques. Tout d'abord, des dosages plasmatiques ont été réalisés. Les biomarqueurs sériques ont l'avantage d'être peu coûteux et faciles à utiliser. L' α -syn peut être dosée dans le plasma grâce à des anticorps en employant des méthodes ELISA sandwich. Néanmoins, la protéine est présente à l'état physiologique dans le sang car elle est sécrétée par les plaquettes et les érythrocytes. La concentration sérique d' α -syn est donc le reflet du taux de production, de dégradation et d'excrétion de la protéine dans l'organisme entier. Les niveaux plasmatiques d' α -syn des patients atteints de synucléinopathies ne présentent pas de différence significative avec le groupe contrôle [88]. D'autres études de détection d' α -syn dans le LCR ont été menées. La recherche d'anticorps détectant les agrégats d' α -syn phosphorylée dans le LCR fait l'objet d'études en cours [89, 90] afin de constituer une aide au diagnostic.

1.3.2.2.2. Un radiotraceur des synucléinopathies

L'imagerie apparaît désormais comme la meilleure technique pour diagnostiquer *in vivo* les synucléinopathies. Le radiotraceur TEP idéal des synucléinopathies doit à la fois répondre aux contraintes des traceurs employés en neuroimagerie et aux contraintes propres à la pathologie (Tableau I) [7, 91].

Radiotraceur neuronal	Radiotraceur des synucléinopathies
<ul style="list-style-type: none"> ➤ administration par voie intraveineuse ➤ fixation et adsorption rapides et spécifiques au niveau de la cible ➤ élimination rapide de la forme non liée ➤ franchissement de la barrière hémato-méningée ➤ connaissance du modèle pharmacocinétique ➤ absence de toxicité ➤ radiomarquage possible au ^{18}F 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ fixation spécifique aux formes pathogènes intracellulaires de l'α-syn ➤ absence de fixation aux autres protéines possédant des structures en feuillets β ➤ réalisation d'un diagnostic formel de synucléinopathie ➤ réalisation d'un diagnostic différentiel entre la MP, la DCL et l'AMS

Tableau I : Caractéristiques d'un radiotraceur des synucléinopathies idéal.

1.3.3. Les radiotraceurs potentiels de l' α -synucléine

Le développement de radiotraceurs TEP de l' α -syn présente donc un intérêt de santé publique majeur. Plusieurs équipes ont débuté des travaux de recherche sur le sujet. Actuellement, trois molécules sont décrites comme présentant une affinité pour l' α -syn sous sa forme pathologique : il s'agit du [^{11}C]PIB, du [^{18}F]BF227 et du [^{125}I]SIL23 (Tableau II) [91].

Comme évoqué précédemment, le [^{11}C]PIB a été initialement développé pour cibler les plaques amyloïdes dans la MA. Cette molécule étant dérivée de la thioflavine T, elle est donc capable de se fixer aux protéines présentant une structure en feuillets β plissés [92]. Il

est concevable que le PIB puisse également se lier à l' α -syn. Cependant, les données précliniques sur l'intérêt du PIB comme un traceur spécifique de synucléinopathie semblent être plutôt incompatibles [93]. Bien qu'il existe des preuves de la liaison du PIB à l' α -syn sous sa forme agrégée *in vitro* et *in vivo*, son affinité beaucoup plus élevée pour les dépôts amyloïdes pose un problème pour la détection sélective de l' α -syn [94]. Néanmoins, il est théoriquement possible que des composés de structure apparentée au PIB puissent surmonter ces obstacles [91].

Une autre molécule candidate, le BF227 ou 2-[2-(2-diméthylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole, présente des résultats plus intéressants que le PIB. Le composé BF227 marqué au ^{11}C est tout d'abord décrit pour se fixer aux fibrilles A β 1-42 et aux plaques β -amyloïdes [95]. Fodero-Tavoletti *et al.* réalisent en 2009 une étude de binding *in vitro* du composé BF227. Le but de cette étude était de tester la capacité du BF227, marqué cette fois au ^{18}F , à reconnaître et à se fixer aux fibrilles d' α -syn présentes dans les corps de Lewy. Pour cela, les auteurs prélèvent des tissus cérébraux après autopsie. Au total, les tissus sont prélevés chez trois patients atteints de MA, trois patients atteints de DCL A β , un patient atteint de DCL pure, deux patients atteints de MP et trois témoins. En parallèle, des fibrilles A β 1-42 et des oligomères d' α -syn sont synthétisés pour être incubés directement avec le radiotraceur. Les résultats montrent, grâce à une analyse de Scatchard, une fixation du [^{18}F]BF227 aux fibrilles d' α -syn avec une forte affinité ($K_d = 9,63 \text{ nM}$). Un site de liaison est mis en évidence. Le [^{18}F]BF227 présente également une affinité avec deux sites de liaison pour les fibrilles A β 1-42 (haute et faible affinité ; $K_d = 1,31 \text{ nM}$ et 80 nM respectivement). Les études de fixation du [^{18}F]BF227 aux tissus cérébraux révèlent une fixation du composé chez les patients atteints de MA et les patients atteints de DCL A β . Aucune fixation du composé au niveau du tissu cérébral du patient atteint de DCL pure (ne

comportant que des fibrilles d' α -syn) n'a pu être mise en évidence. Ces résultats montrent que la fixation du [^{18}F]BF227 à l' α -syn contenue dans les corps de Lewy ne permet pas l'obtention d'un signal TEP exploitable. La présence concomitante de fibrilles A β 1-42 est nécessaire à l'émission du signal [8].

En 2010, Kikuchi *et al.* réalisent une étude *in vivo*. Seize patients sont inclus : huit patients avec un diagnostic probable d'AMS et huit sujets contrôles. Ces sujets reçoivent une injection intra veineuse de 136,9 à 307,1 MBq de [^{11}C]BF227. Les auteurs réalisent également des tests *in vitro* sur tissus provenant de neuf cerveaux autopsiés : trois sujets atteints de MP, trois sujets atteints de DCL et trois sujets atteints d'AMS. Les résultats de l'étude *in vivo* montrent une différence de clairance du [^{11}C]BF227 entre les sujets atteints d'AMS et les sujets contrôles : le composé est éliminé plus rapidement chez les sujets atteints d'AMS. Concernant les images obtenues à l'aide de caméra TEP, les auteurs observent une forte fixation du [^{11}C]BF227 dans la partie sous corticale de la substance blanche et du noyau lenticulaire pour les patients d'AMS. Le volume de distribution du radiotraceur est significativement plus élevé chez les patients atteints d'AMS que dans la population contrôle. Les auteurs observent un volume de distribution élevé au niveau de la matière blanche sous-corticale, du cortex cingulaire postérieure, du putamen, du globus pallidus, du cortex moteur primaire, du cortex cingulaire antérieur et la substance noire chez les patients atteints d'AMS par rapport aux sujets témoins (Figure 13).

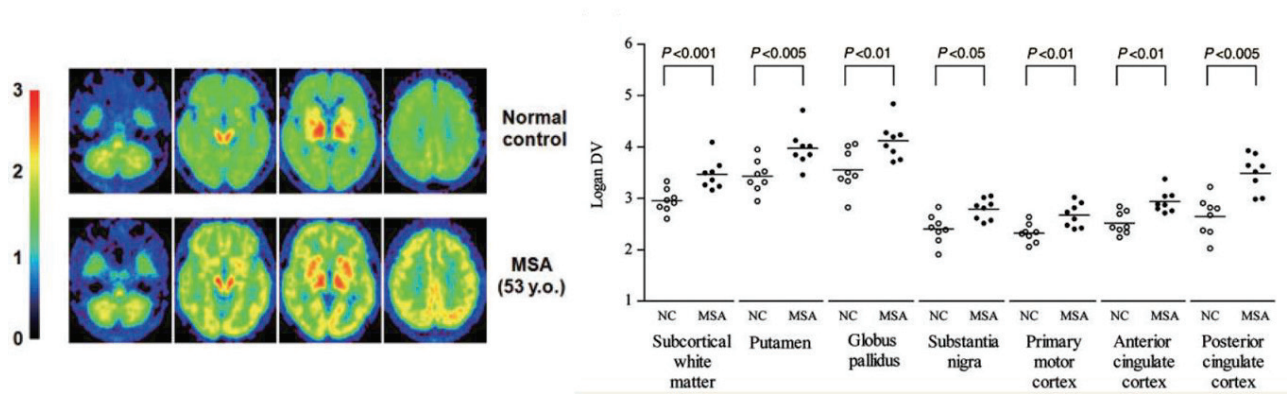


Figure 13 : Distribution du $[^{11}\text{C}]\text{BF227}$ chez des patients atteints d'AMS versus des sujets témoins [9].

Aucune différence de distribution n'a été observée entre les patients atteints d'AMS avec un parkinsonisme prédominant et les patients atteints d'AMS avec une ataxie cérébelleuse prédominante. La fixation du traceur ne semble pas être corrélée avec les symptômes de la maladie. Les tests réalisés sur les tissus cérébraux ont révélé une fixation du $[^{11}\text{C}]\text{BF227}$ au niveau des corps de Lewy dans la substance noire. Une forte rétention du radiotraceur est observée dans le noyau central. Pour les cerveaux atteints d'AMS, le $[^{11}\text{C}]\text{BF227}$ se fixe au niveau des inclusions cytoplasmiques gliales de la base pontique. Des tests immuno-histochimiques employant un anticorps dirigés contre l' α -syn phosphorylée au niveau des mêmes tissus cérébraux mettent en évidence des résultats similaires bien que toutes les inclusions intracytoplasmiques détectées par les anticorps n'aient pas été mises en évidence avec le $[^{11}\text{C}]\text{BF227}$ [9].

Dernièrement, une nouvelle molécule, le $[^{125}\text{I}]\text{SIL23}$, a montré des propriétés de liaison *in vitro* aux fibrilles d' α -syn présentes dans le tissu cérébral de patients atteints de MP ainsi qu'au niveau d'homogénats de cerveaux de souris transgéniques TgM83 surexprimant l' α -syn [98]. Néanmoins, ce composé est également capable de se fixer à d'autres structures présentant une conformation β plissée. Les affinités du composé pour les différentes cibles testées à savoir α -syn, A β et Tau sont de 148, 635 et 230 nM respectivement. S'ajoute à

cette fixation non spécifique, l'existence d'une autre liaison non spécifique dans la matière blanche (liée à des interactions lipophiles), limitant l'utilisation de cette molécule comme radiotraceur des synucléinopathies [96].

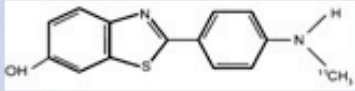
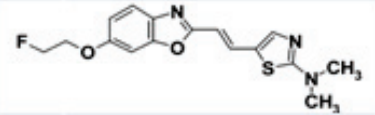
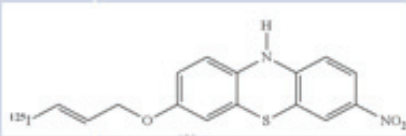
Molécule	Structure	Affinité pour l' α -syn <i>in vitro</i> (nM)	Affinité pour l'A β 1-42 <i>in vitro</i> (nM)	Affinité pour l' α -syn sur homogénats de cerveaux (nM)	Affinité pour l'A β 1-42 sur homogénats de cerveaux (nM)
[¹¹ C]PIB		Kd = 4	Kd = 4,7	DCL (avec A β 1-42) Kd = 5,5	(cortex frontal MA) Kd = 1.4
[¹⁸ F]BF227		Kd = 9.63	Kd ₁ = 1,31 Kd ₂ = 80	Pas de fixation sur DCL pure	MA Kd = 3,77
[¹²⁵ I]SIL23		Kd = 148	Kd = 635	MP Kd = 119.1–168.3	Non testé

Tableau II : Caractéristiques des potentiels radiotraceurs de l' α -syn [91].

PARTIE 2
LA NEUROTRANSMISSION
SEROTONINERGIQUE DANS LES
SYNUCLEINOPATHIES

1. La sérotonine

1.1. Généralités

La découverte de la sérotonine fut attribuée en 1946 à Vittorio Espamer qui décrit l'existence d'une substance possédant des propriétés vasoconstrictrices et agissant sur la tonicité des vaisseaux [97]. Quelques années plus tard, certains auteurs constatèrent que cette molécule correspondait chimiquement à un autre facteur découvert auparavant : l'entéramine [98]. L'entéramine était décrite comme une substance agissant sur le péristaltisme intestinal. Elle est sécrétée au niveau des cellules entérochromaffines de l'intestin. En réalité, l'entéramine et la sérotonine sont une seule et même molécule : la 5-hydroxytryptamine ou 5HT (Figure 14).

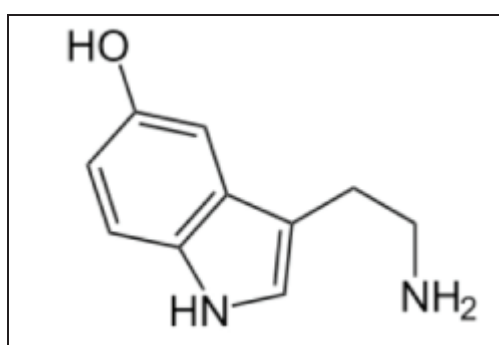


Figure 14 : Structure chimique de la sérotonine (5HT)

La 5HT est une amine biogène présente chez un grand nombre d'organismes vivants. Elle est retrouvée à la fois chez des espèces animales (des ascidies jusqu'aux mammifères) mais également chez des espèces appartenant au règne végétal [99] .

1.2. Métabolisme de la sérotonine

1.2.1. Biosynthèse

La sérotonine est synthétisée à partir du L-tryptophane (Figure 15). En effet, outre la voie métabolique conduisant à la synthèse sérotonine, le tryptophane est utilisé dans la synthèse des protéines et est converti sous l'action d'enzymes : la tryptophane pyrrolase hépatique (ou également appelée tryptophane 2-3-dioxygénase) et l'indoleamine-2,3-dioxygénase en N-formylkynurénine puis en kynurénine, précurseur notamment de l'acide xanthurénique et de l'acide nicotinique. L'activité de la tryptophane pyrrolase est augmentée par le cortisol, la consommation d'éthanol et la prise de tryptophane. L'activité de l'indoleamine-2,3-dioxygénase est augmentée en cas de stimulation du système immunitaire. L'activation de ces 2 enzymes de la voie kynurénine pourrait réduire la quantité de tryptophane disponible pour la biosynthèse de sérotonine [100].

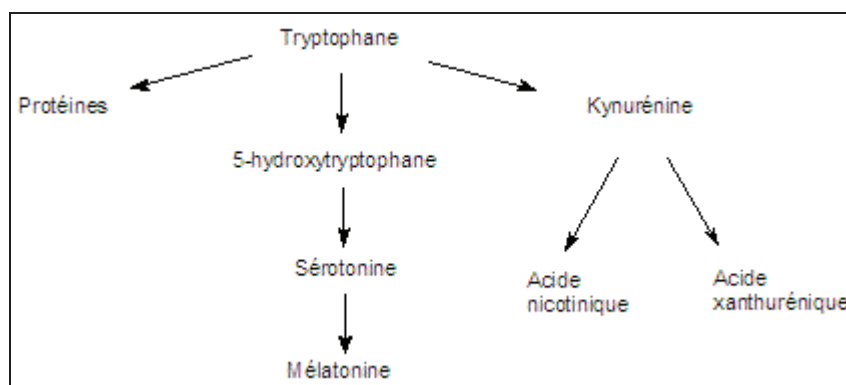


Figure 15 : Principales voies métaboliques du tryptophane [100]

La transformation du tryptophane en sérotonine comporte deux étapes (Figure 16) :

1- hydroxylation en 5-hydroxytryptophane sous l'influence de la tryptophane hydroxylase qui est l'étape limitante de la synthèse. Le fonctionnement de l'enzyme nécessite la présence de tétrahydrobioptérine, d'oxygène, du NADPH₂ et d'un métal, fer ou cuivre.

2- décarboxylation du 5-hydroxytryptophane en sérotonine sous l'influence de la décarboxylase des acides aminés L-aromatiques, en présence de pyridoxal-phosphate.

Dans le cerveau, la synthèse de sérotonine dépend de la quantité de tryptophane qui y pénètre à travers la BHE. Seul le tryptophane plasmatique libre, non lié à l'albumine, pénètre dans le cerveau; la diminution du pourcentage de forme libre réduit donc sa pénétration. De plus, d'autres acides aminés sont en compétition avec le tryptophane libre et limitent son franchissement de la BHE. Le cortisol plasmatique, qui est augmenté chez les sujets déprimés, diminue les concentrations de L-tryptophane et de L-tyrosine libres dans le plasm. L'insuline a un effet inverse en abaissant la concentration des acides aminés autres que le tryptophane [100].

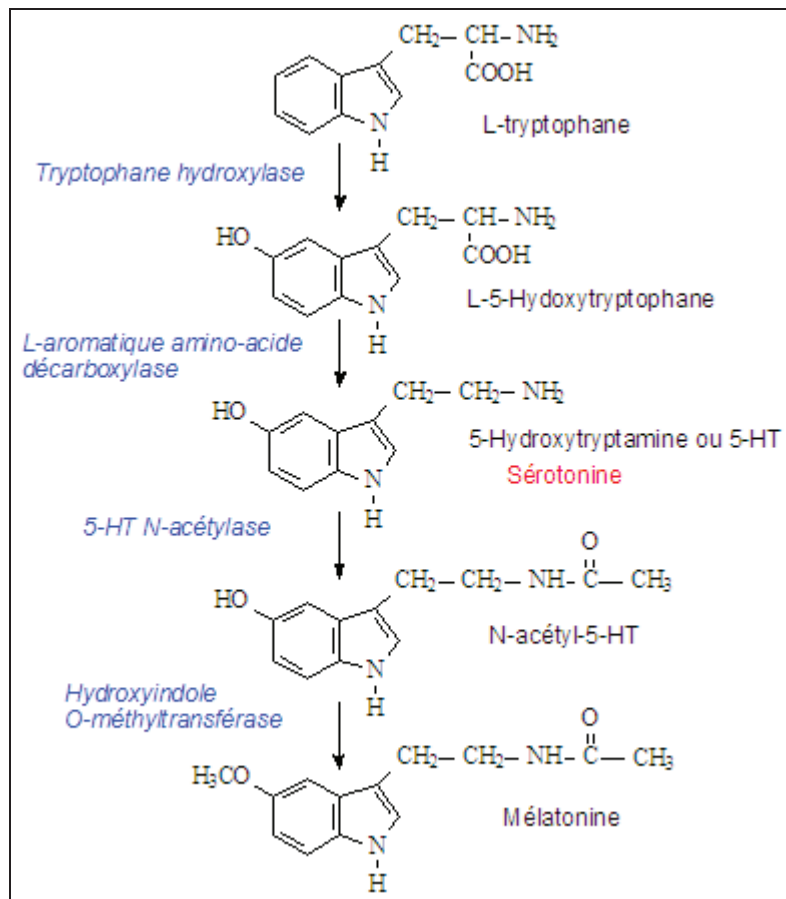


Figure 16 : Biosynthèse de la sérotonine [100]

1.2.2. Distribution

La sérotonine est présente :

- au niveau du tube digestif qui en contient 95% du total de l'organisme, localisée dans les cellules entérochromaffines,
- dans le système nerveux central de toutes les espèces : la teneur est plus élevée dans le tronc cérébral que dans le cortex. La sérotonine, libérée par les neurones sérotoninergiques au niveau des fentes synaptiques est, en grande partie, recaptée par ces derniers.

- dans les plaquettes sanguines : pratiquement toute la sérotonine du sang (concentration allant de 100 à 200 µg/L) est contenue dans les plaquettes qui ne la synthétisent pas, mais la fixent à partir du plasma où elle est libérée par les cellules entérochromaffines. La capture de la sérotonine par les plaquettes est très rapide. La demi-vie de la sérotonine dans les plaquettes est du même ordre que celle des plaquettes, c'est-à-dire environ 7 à 10 jours. La sérotonine plaquettaire peut être libérée dans le plasma et avoir un effet relativement localisé au niveau des vaisseaux où elle a été libérée, par exemple dans le cas de la migraine. La demi-vie de la sérotonine est longue dans les plaquettes et l'intestin, et très courte (de l'ordre de quelques minutes) dans le cerveau. La concentration d'une substance dans un organe, vue statique d'un phénomène dynamique, n'est pas nécessairement un reflet fidèle de l'activité métabolique [100].

1.2.3. Catabolisme

La sérotonine est transformée en molécules inactives par biotransformations (Figure 17) :

- désamination oxydative de la chaîne aminée latérale sous l'influence de la monoamine oxydase, ce qui conduit au 5-hydroxy-indol-acétaldéhyde qui est ensuite oxydé en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) que l'on trouve dans les urines à des quantités normalement inférieures à 10 mg/24 h.
- conjugaison du groupe -OH en position 5 par l'acide glucuronique ou le sulfate [100].

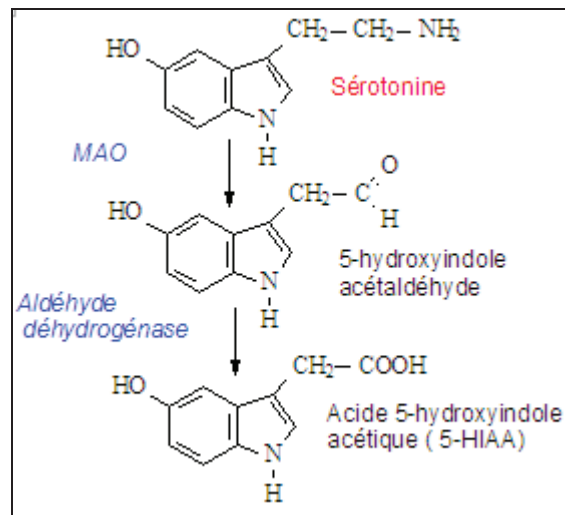


Figure 17 : Catabolisme de la sérotonine [100]

1.3. La sérotonine dans le système nerveux central

1.3.1. Les corps cellulaires

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques (également appelés somas) ont été décrits pour la première fois en 1964 par Dählström et Fuxe [101]. Chez l'homme, ces neurones représentent un ensemble d'environ 350 000 cellules. Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont regroupés en neuf noyaux répertoriés de B1 à B9. Ils sont majoritairement présents dans la partie médiane des noyaux du raphé allant de la medulla oblongata à la partie médiane du mésencéphale et dans la formation réticulée (Figure 18).

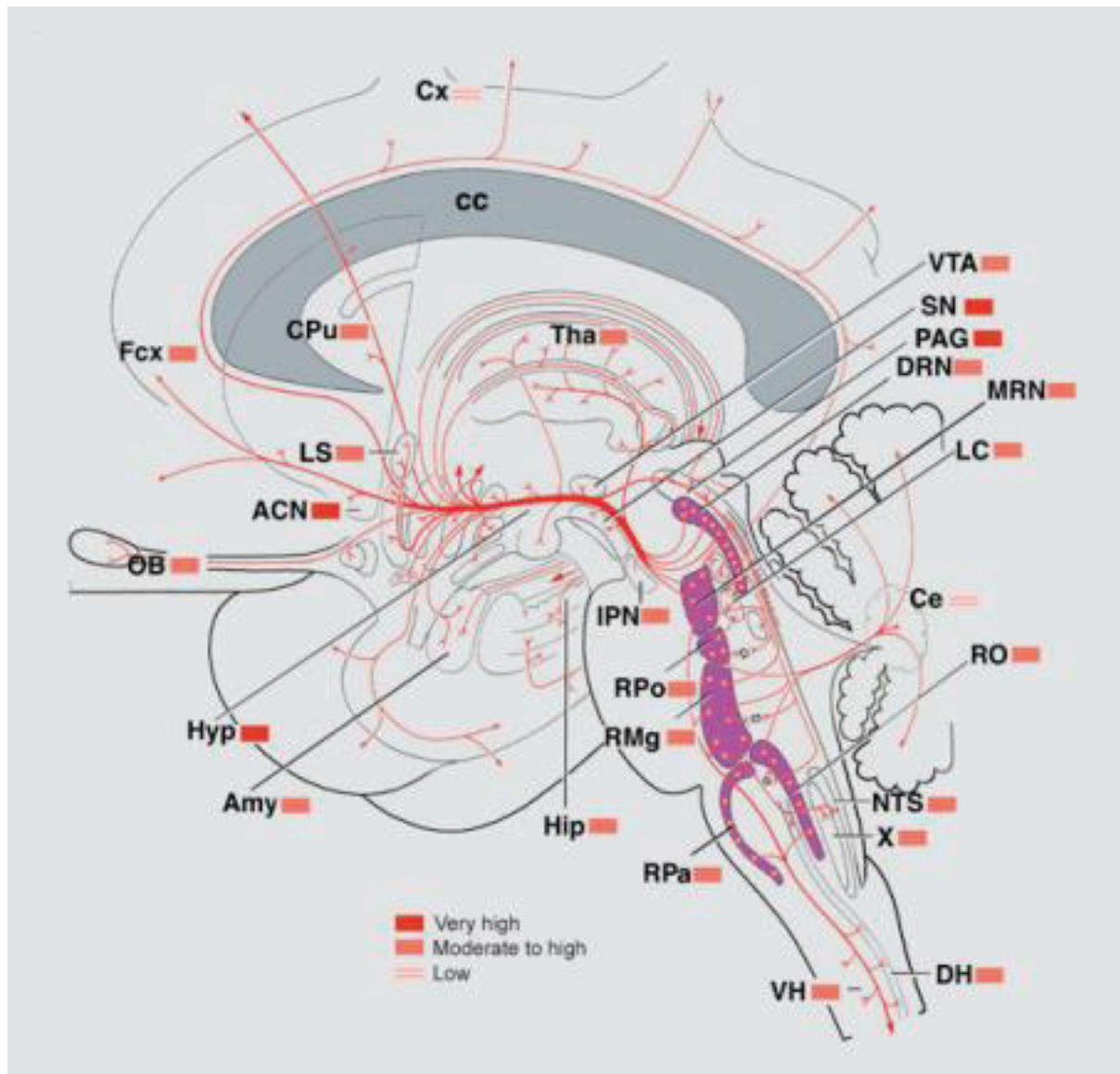


Figure 18 : Schéma d'une coupe sagittale de cerveau humain représentant la distribution du système sérotoninergique [102].

Les noyaux du raphé (NDR) sont représentés en violet et les axones issus des somas sérotoninergiques sont représentés en rouge. Seules les aires terminales principales sont représentées et la densité du réseau axonale sérotoninergique, dans ces aires principales, sont indiquées dans la légende .

X, dorsal motor n of the vagus nerve; ACN, accumbens n; Amy, amygdala; cc, corpus callosum; Ce, cerebellum; CPu, caudate ---putamen; Cx, cortex; DH, dorsal horn spinal cord; DRN, dorsal raphe n; Fcx, frontal cortex; Hip, hippocampus; Hyp, hypothalamus; IPN, interpeduncular n; LC, locus coeruleus; LS, lateral septum; MRN, median raphe n; n, noyaux; NTS, n of the solitary tract; OB, olfactory bulb; PAG, periaqueductal gray; RMg, raphe magnus n; RO, raphe obscurus n; Rpa, raphe pallidus; RPo, raphe pontis n; SN, substantia nigra; Tha, thalamus; VH, ventral horn; VTA, ventral tegmental area.

Les groupes B1 à B5 sont présents au niveau caudal entre la partie rostrale du pons et la medulla oblongata. Leur nombre de corps cellulaires est inférieur à celui des autres groupes.

Les groupes B6 et B7, possédant un plus grand nombre de corps cellulaires, constituent le noyau du raphé dorsal (NRD). Le groupe B8 représente le noyau du raphé médian (NRM) et le groupe B9 forme son extension latérale mais n'est pas inclus dans le NRM. Le NRD contient à lui seul 50 à 60 % des neurones sérotoninergiques [103] . Des études récentes ont montré que les neurones sérotoninergiques du NRD ne constituaient pas une classe cellulaire homogène. Deux classes cellulaires peuvent être identifiées. En effet, ces neurones présentent des caractéristiques anatomiques et des propriétés électro-physiologiques hétérogènes [104].

La figure 19 représente un neurone sérotoninergique.

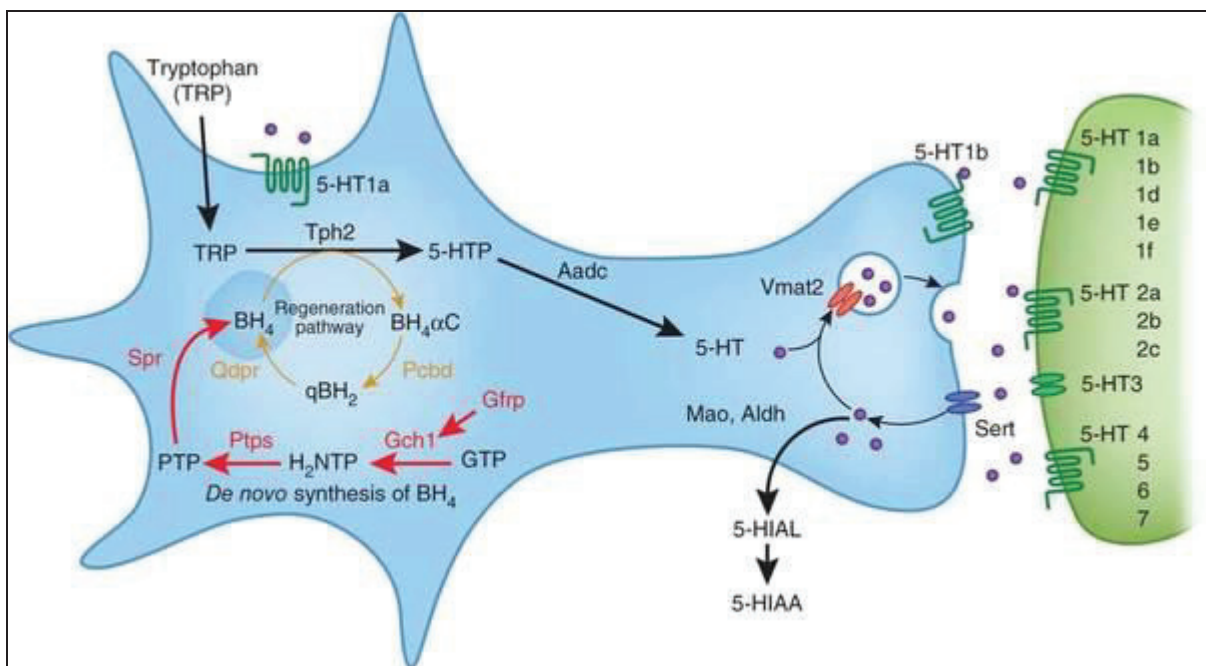


Figure 19 : Représentation d'un neurone sérotoninergique [105]

1.3.2. Les projections

Les somas sérotoninergiques innervent l'ensemble du SNC par des projections efférentes qui peuvent être séparées en deux groupes :

1- *Les projections ascendantes* : elles innervent les structures cérébrales supérieures (cortex, thalamus, hypothalamus, etc) ;

2- *Les projections descendantes* qui vont vers le tronc cérébral et la moelle épinière (Figure X). Les corps cellulaires qui projettent les voies descendantes font partie des groupes situés caudalement et représentent environ 15 % de la population neuronale sérotoninergique.

Les voies ascendantes, issues des 85% de neurones sérotoninergiques qui constituent les groupes situés au niveau rostral, vont innervent l'ensemble du SNC [106]. Les fibres originaires du NRM innervent l'hippocampe, le septum, l'hypothalamus, l'amygdale, le cortex cingulaire et le cortex occipital. Le NRD se projette sur le *locus coeruleus*, le *locus niger*, le thalamus et l'hypothalamus, le striatum, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex entorhinal et le cortex frontal [107]. Enfin, il existe des projections sérotoninergiques au sein des noyaux du raphé, le NRD projetant sur le NRM, la formation réticulée recevant des axones sérotoninergiques sur les noyaux moteurs des nerfs crâniens [108].

1.4. Rôle de la sérotonine

Au travers de ses récepteurs, la sérotonine est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques : la thermorégulation, la régulation des cycles veille-sommeil, la régulation cardiovasculaire, le comportement sexuel, le comportement alimentaire, le

contrôle de la douleur, le contrôle émotionnel, certains processus cognitifs comme la mémoire et l'apprentissage et enfin la morphogénèse cérébrale. Ainsi, les dysfonctions du système sérotoninergique sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques tels que le syndrome de mort subite du nourrisson, l'autisme, les céphalées, certains troubles de l'humeur ou du comportement comme l'anxiété et la dépression, l'anorexie, la schizophrénie ou les maladies neurodégénératives comme la MP ou encore la MA [102, 109].

Concernant les effets au niveau périphérique de la sérotonine, nous pouvons répertorier :

1. Les effets cardiovasculaires

Ces effets sont extrêmement complexes. Ils sont variables selon la dose injectée, selon les conditions expérimentales, selon les espèces et selon l'état vasculaire.

a. Action sur les vaisseaux :

La sérotonine provoque soit une vasoconstriction par effet 5-HT₂, en particulier des vaisseaux rénaux, soit une vasodilatation. La réponse dépendrait du tonus préalable des vaisseaux et de leur état normal ou pathologique : ainsi l'administration de sérotonine par voie intracoronaire provoque une vasodilatation lorsque les coronaires sont normales et une vasoconstriction quand elles sont lésées. La sérotonine contracte les veines et semble favoriser les thromboses veineuses. On peut lui prêter une action pro-agrégante plaquettaire. Elle augmente également la perméabilité capillaire.

b. Action sur le cœur :

La sérotonine a une action chronotrope positive par effet 5-HT₄ et pourrait participer à la genèse de certains troubles du rythme cardiaque. Elle a également un effet inotrope positif.

c. Action sur la tension artérielle :

Elle est extrêmement complexe. Selon les conditions expérimentales, on observe soit une hypotension, soit une faible hypertension, soit aucune modification.

d. Action sur les muscles lisses

La sérotonine entraîne des contractions de l'intestin, de l'utérus, des bronches et des uretères. La sérotonine augmente la motilité intestinale, probablement par stimulation des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₃ : chez l'homme, injectée par voie intraveineuse, elle augmente la motilité du duodénum et de l'intestin grêle. Cette action explique la diarrhée observée dans le syndrome carcinoïdien. La sérotonine a également un effet émétisant par stimulation des récepteurs 5-HT₃. Ces récepteurs sont présents au niveau des terminaisons vagales du tube digestif et au niveau de l'*area postrema* (chemoreceptor trigger zone), qui est accessible à la sérotonine circulante périphérique. Leur stimulation déclenche des nausées et des vomissements, et les antagonistes 5-HT₃ sont utilisés pour éviter les vomissements provoqués par certains traitements antinéoplasiques. Elle a une action ulcérogène, son administration à l'animal à fortes doses entraîne des ulcérations gastriques.

e. Action sur les bronches :

Elle a une action bronchoconstrictrice; un aérosol de sérotonine entraîne une dyspnée.

f. Action sur l'utérus :

La sérotonine provoque des contractions de l'utérus.

g. Autres actions

La sérotonine intervient dans des manifestations allergiques et inflammatoires. Elle joue un rôle important dans certaines maladies :

Syndrome carcinoïdien :

Les tumeurs des cellules entérochromaffines du tube digestif sont métastasiées et sécrètent diverses substances, notamment une grande quantité de sérotonine. Celle-ci entraîne une diarrhée, des flushs ou poussées de vasodilatation cutanée suivies d'une vasoconstriction, une dyspnée asthmatiforme et parfois une atteinte des valvules cardiaques. Le diagnostic biologique de ces tumeurs repose sur l'augmentation de la concentration de sérotonine dans le sang et de l'excrétion de l'acide 5-hydroxy-indolacétique ou 5-HIAA dans les urines.

Migraine :

La migraine est une maladie familiale caractérisée par des accès itératifs de céphalées où les phénomènes vasomoteurs et la sérotonine jouent un rôle déterminant. Dans la première phase prodromique, il y a une vasoconstriction, et dans la deuxième phase douloureuse, une vasodilatation. Cette vasodilatation est réduite par des médicaments vasoconstricteurs.

Ischémie myocardique :

La sérotonine libérée à partir des plaquettes semble aggraver l'ischémie myocardique par vasoconstriction.

2. Effets centraux

Les effets de la sérotonine au niveau du système nerveux central sont nombreux et complexes, encore mal connus mais d'une importance considérable sur le plan pharmacologique car de nombreux médicaments agissent par son intermédiaire. La sérotonine intervient dans la régulation du sommeil, de l'humeur (action antidépressive), de la température, de l'appétit (effet anorexigène). Une hyperstimulation des récepteurs 5-HT₂ pourrait favoriser l'apparition de certains symptômes de type productif et négatif des états

psychotiques. Le LSD, lysergide ou diéthyl-lysergamide, est un hallucinogène, agoniste des récepteurs 5-HT₂ ainsi que des récepteurs dopaminergiques D1 et D2.

La sérotonine, grâce à ses divers types de récepteurs présynaptiques et postsynaptiques, module l'activité des autres médiateurs. Elle joue un rôle déterminant dans l'adaptation [100].

1.5. Les récepteurs sérotoninergiques

1.5.1. Généralités

Un progrès majeur dans la compréhension du rôle de la sérotonine fut l'identification de ses différents récepteurs au cours des dix dernières années. La classification des récepteurs de la sérotonine fut initiée en 1957 par Gaddum et Picarelli distinguant des récepteurs de type M (neurotropes) ou de type D (musculotropes) en raison de la réponse contractile à la sérotonine sur l'intestin du cochon d'Inde qui pouvait être bloquée pour une partie par la morphine (M) et pour la réponse restante par la dibenzyline (D) [110]. Il faudra attendre 1979, pour que Peroutka et Snyder démontrent l'existence de deux sites distincts de fixation pour la sérotonine : 5-HT₁ et 5-HT₂, ce dernier correspond pharmacologiquement au récepteur D [111]. En 1986, Bradley *et al.* proposent une classification en trois groupes : 5-HT₁-like, 5-HT₂ et 5-HT³, ce dernier correspondant aux récepteurs M précédemment décrits [112]. Entre 1987 et 1992, la plupart des récepteurs de la sérotonine furent clonés, dont au moins 14 types distincts chez les mammifères [113, 114]. Les récepteurs sérotoninergiques représentent l'une des plus complexes familles de récepteurs aux neurotransmetteurs. Ils sont classés en 7 classes (5-HT₁ à 5-HT₇) selon leur homologie de séquence et de structure, ainsi que selon leur mécanisme effecteur préférentiel (Tableau X).

Quatre sous-types peuvent être distingués :

1. les récepteurs 5-HT₁ couplés aux protéines Gi/o et inhibant l'adénylate-cyclase,
2. les récepteurs 5-HT₂ couplés aux protéines Gq et activant la phospholipase C,
3. les récepteurs 5-HT₃ formant des canaux ioniques
4. les récepteurs 5-HT_{4/6/7} couplés aux protéines Gs et activant l'adénylate-cyclase.

Le couplage des récepteurs 5-HT₅ reste encore incertain. On ignore s'il est activateur ou inhibiteur de l'adénylate cyclase [113, 114]. Donc à l'exception des récepteurs 5-HT₃ qui sont des récepteurs canaux, tous les récepteurs de la sérotonine appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Néanmoins, ce couplage n'est pas exclusif et d'autres types de protéines G et d'effecteurs intracellulaires peuvent intervenir pour une même classe de récepteur [115].

Pendant de nombreuses années, aucun nouveau récepteur n'a été identifié. Cependant, une seconde (5-HT_{3B}) voire une troisième (5-HT_{3C}) sous-unité du récepteur 5-HT₃ ont été décrites ainsi que plusieurs variants d'épissage alternatif (5-HT₄, 5-HT₇) et des isoformes (5-HT_{2C}). Enfin, certains de ces récepteurs ont la capacité de former des homo- ou des hétéro-dimères (5-HT_{1B/1D}), comme cela a été montré pour d'autres RCPGs

La figure 20 représente les caractéristiques des récepteurs sérotoninergiques et le tableau III leur distribution et leur fonction ainsi que leurs agonistes et antagonistes.

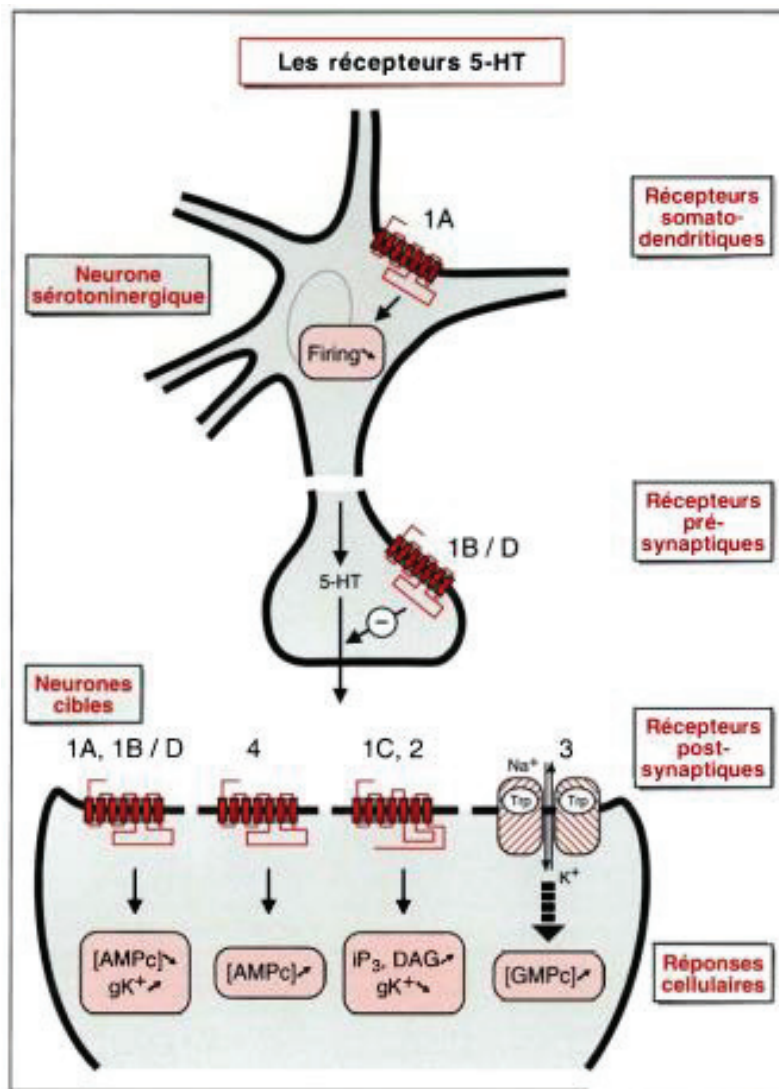


Figure 20 : Localisation des différents types de récepteurs centraux de la 5-HT par rapport aux neurones sérotoninergiques [116].

Récepteur	Distribution	Fonction	Agonistes	Antagonistes
5-HT_{1A}	Vaisseaux sanguins SNC	Addiction Agression Anxiété Appétit Pression artérielle Fonction cardiovasculaire Vomissements Fréquence cardiaque Impulsivité Mémoire Humeur Nausée Nociception Dilatation de la pupille Respiration Comportement sexuel Sommeil Sociabilité Régulation thermique Vasoconstriction	5-CT 8-OH-DPAT Aripiprazole Buspirone Clozapine Dihydroergotamine Eltoprazine Ergotamine Flesinoxan Flibanserin Gepirone Haloperidol Ipsapirone Methysergide Quetiapine (pas le XR) RU 24969 Tandospirone Urapidil Xaliproden Yohimbine Ziprasidone	Alprenolol Asenapine BMY 7378 Cyanopindolol Iodocyanopindolol Lecozotan Methiothepin NAN-190 Oxprenolol Pindolol Propranolol Robalzotan S15535 Spiperone UH-301 WAY-100,135 WAY-100,635
5-HT_{1B}	Vaisseaux sanguins SNC	Addiction Agression Anxiété Apprentissage Locomotion Mémoire Humeur Comportement sexuel Vasoconstriction	5-CT CP-93,129 CP-94,253 Dihydroergotamine Eletriptan Eltoprazine Ergotamine Methysergide RU 24969 Sumatriptan	Alprenolol AR-A000002 Asenapine Cyanopindolol GR 127935 Iodocyanopindolol Isamoltane Metergoline Methiothepin Oxprenolol

			TFMPP Zolmitriptan	Pindolol Propanolol SB-216,641 Yohimbine
5-HT_{1D}	Vaisseaux sanguins SNC	Anxiété Locomotion Vasoconstriction	5-CT Almotriptan Dihydroergotamine Eletriptan Ergotamine Frovatriptan Methysergide Naratriptan Rizatriptan Sumatriptan Yohimbine Zolmitriptan	BRL-15572 GR 127935 Ketanserin Metergoline Methiothepin Rauwolscline Ritanserin
5-HT_{1E}	Vaisseaux sanguins SNC		Eletriptan Methysergide Tryptamine	Methiothepin
5-HT_{1F}	Vaisseaux sanguins SNC	Vasoconstriction	Eletriptan Naratriptan Sumatriptan	Methiothepin
5-HT_{2A}	Vaisseaux sanguins SNC Digestion Plaquettes SNP Muscles lisses	Addiction Anxiété Appétit Cognition Imagination Apprentissage Mémoire Humeur Perception Comportement sexuel Sommeil Régulation thermique	2C-B 5-MeO-DMT BZP Bufotenin DMT DOM Ergonovine Lisuride LSD Mescaline Myristicine Psilocin	Aripiprazole Asenapine Clozapine Cyproheptadine Eplivanserin Etoperidone Haloperidol Iloperidone Ketanserin Methysergide Miansérine Mirtazapine

		Vasoconstriction	Psilocybin TFMPP Yohimbine	Nefazodone Olanzapine Pimavansérine Pizotifen Quetiapine Risperidone Ritanserin Trazodone Ziprasidone
5-HT_{2B}	Vaisseaux sanguins SNC Digestion Plaquettes SNP Muscles lisses	Anxiété Fonction cardiovasculaire Motilité gastro-intestinale Sommeil Vasoconstriction	BW-723C86 MDMA Norfenfluramine Ro60-0175	Agomélatine Asenapine BZP Ketanserin Methysergide Ritanserin Tegaserod Yohimbine
5-HT_{2c}	Vaisseaux sanguins SNC Digestion Plaquettes SNP Muscles lisses	Addiction Anxiété Appétit Motilité gastro-intestinale Locomotion Humeur Comportement sexuel Sommeil Régulation thermique Vasoconstriction	A-372,159 AL-38022A Aripiprazole Ergonovine Fenfluramine Lorcaserine Ro60-0175 TFMPP YM-348	Agomélatine Asenapine Clozapine Cyproheptadine Dimebolin Duloxétine Eltoprazine Etoperidone Fluoxetine Haloperidol Iloperidone Ketanserin Lisuride Methysergide Mianserin Mirtazapine Nefazodone

				Olanzapine Paroxétine Quetiapine Risperidone Ritanserin Trazodone Venlafaxine Ziprasidone
5-HT₃	SNC Digestion SNP	Addiction Anxiété Vomissements Motilité gastro-intestinale Apprentissage Mémoire Nausée	2-Methyl-5-HT BZP Quipazine RS-56812	Alosetron Clozapine Dolasétron Granisetron Memantine Metoclopramide Mianserin Mirtazapine Olanzapine Ondansetron Quetiapine Tropisetron
5-HT₄	SNC Digestion SNP	Anxiété Appétit Motilité gastro-intestinale Apprentissage Mémoire Humeur Respiration	5-MT BIMU-8 Cisapride Cinitapride Metoclopramide Mosapride Prucalopride RS-67333 Renzapride Tegaserod Zacopride	L-Lysine Piboserod
5-HT_{5A}	SNC	Locomotion Sommeil	5-CT Ergotamine Valerenic Acid	Asenapine Dimebolin Methiothepin

				Ritanserin SB-699,551 SB-699,551-A
5-HT₆	SNC	Anxiété Cognition Apprentissage Mémoire Humeur	EMD-386,088 EMDT	Aripiprazole Asenapine Clozapine Dimebolin EGIS-12233 Haloperidol Iloperidone MS-245 Olanzapine Ro04-6790 SB-258,585 SB-271,046 SB-357,134 SB-399,885
5-HT₇	Vaisseaux sanguins SNC Digestion	Anxiété Mémoire Humeur Respiration Sommeil Régulation thermique Vasoconstriction	5-CT 8-OH-DPAT AS-19	Aripiprazole Asenapine Clozapine EGIS-12233 Haloperidol Iloperidone Ketanserin Olanzapine Ritanserin SB-269,970

Tableau III : Récepteurs sérotoninergiques (d'après [114])

1.5.2. Le récepteur 5HT_{1A}

1.5.2.1. Généralités

De tous les récepteurs à la sérotonine, le récepteur 5HT_{1A} est le plus étudié depuis les premières recherches qui datent des années 80. En effet, grâce à l'utilisation la sérotonine tritiée, les scientifiques mettent en évidence les sites de fixation du récepteur 5HT_{1A} [117]. Puis, la synthèse d'un agoniste spécifique des récepteurs 5HT_{1A}, le 8-OH-DPAT [118], et son radiomarquage au tritium ont permis les premières études de distribution de ce récepteur par autoradiographie [119, 120]. Par la suite, El Mestikawy réussit la production d'anticorps anti 5-HT_{1A} qui constitue un outil supplémentaire pour l'étude de ce récepteur [121, 122]. Le récepteur 5HT_{1A} a été le premier des récepteurs sérotoninergiques à être entièrement cloné et séquencé [123, 124]. Il possède 50 % d'homologie de séquence avec le récepteur bêta 2-adrénergique dans sa partie transmembranaire [125]. Ce récepteur appartient à la super famille des RCPGs, il s'agit donc d'un récepteur à sept domaines transmembranaires [113] qui possède des sites de phosphorylation pour la protéine kinase C (PKC) sur les deuxième et troisième boucles intracellulaires (Figure 21).

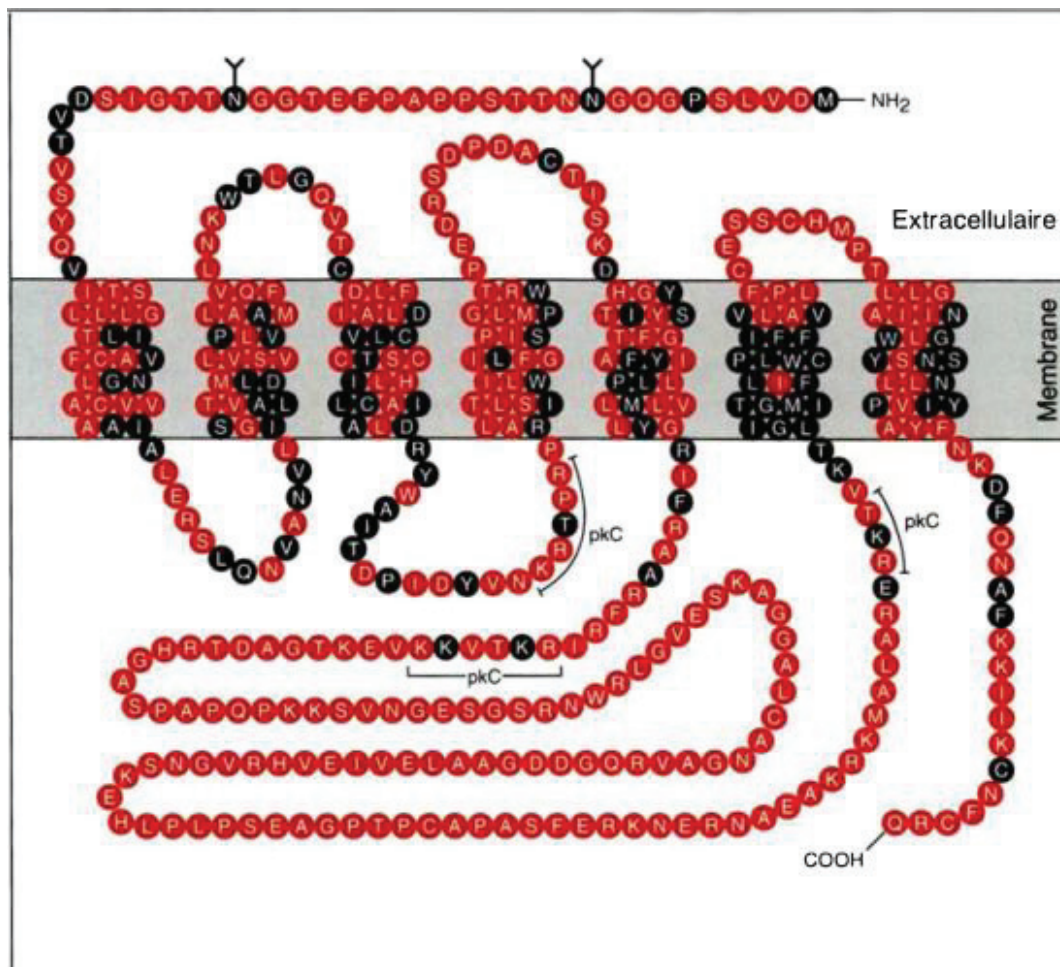


Figure 21 : Structure moléculaire du récepteur 5-HT_{1A} [126]

1.5.2.2. Distribution

Concernant la distribution régionale et cellulaire des récepteurs 5-HT_{1A}, son analyse fut dépendante des méthodes neuroanatomiques disponibles. On peut citer le [³H]8-OH-DPAT [127-129], la [³H]5-HT le [³H]ipsapirone, le [¹²⁵I]p-MPPI et le [³H]WAY100635 [127-129-[130]-[131]-[132, 133]. Ces études ont toutes été effectuées chez le rat. Elles ont montré que les sites de fixation des récepteurs 5-HT_{1A} sont particulièrement abondants dans le gyrus denté et la couche CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe, le septum latéral, le cortex entorhinal et le cortex frontal. Une expression significative, mais de moindre

importance, a également été rapportée dans certains noyaux thalamiques et hypothalamiques. Par contre, les récepteurs 5-HT_{1A} ont rarement été détectés dans le striatum, la substance noire, et le cervelet [134]. Ces recherches ont été complétées par immunohistochimie utilisant un anticorps spécifique anti 5-HT_{1A} obtenu par immunisation chez le lapin [121]. La distribution autoradiographique des récepteurs 5-HT_{1A} a été confirmée par cette dernière technique, qui met en évidence un marquage intense dans les mêmes zones [85, 134]. L'analyse de la distribution du récepteur 5-HT_{1A} a été complétée par des études d'hybridation *in situ* avec différentes sondes marquées au phosphore 32 et spécifiques de la séquence d'ARNm codant la troisième boucle intracellulaire [135]. Cette étude met en évidence que l'ARNm du récepteur 5-HT_{1A} est localisé dans les mêmes régions que celles qui portent son expression protéique. Ainsi les récepteurs ne sont pas transportés loin de leur site de production et sont adressés au compartiment somatodendritique du neurone [134]. La distribution subcellulaire des récepteurs 5-HT_{1A} a été déterminée par double marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti 5-HT_{1A} et un autre anticorps anti-sérotonine. Au sein du NRD et du NRM, toutes les cellules marquées par l'anticorps font également l'objet d'un marquage par l'anticorps anti-5HT [136]. Ainsi, au niveau du NRD et du NRM, les récepteurs 5-HT_{1A} sont localisés sur des neurones sérotoninergiques, on parle donc d'autorécepteurs.

D'autre part, certains auteurs ont montré que la réalisation d'une lésion sérotoninergique, par injection d'une neurotoxine spécifique comme la 5,7 dihydroxytryptamine ou DHT, provoque une disparition du marquage autoradiographique du [³H]8-OH-DPAT dans le NRD mais aucune variation dans les aires de projections [129]. Ce résultat montre que les récepteurs 5-HT_{1A} situés dans les aires de projections sérotoninergiques sont exprimés par des neurones non sérotoninergiques, il s'agit donc d'hétéro-récepteurs.

Enfin, des études mêlant les techniques d'immunohistochimie et de microscopie électronique montrent que l'immunoréactivité des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau du NRD est observée uniquement au niveau somatodendritique. Dans l'hippocampe, ce sont les somas et les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA1 ainsi que les cellules granuleuses qui présentent une immunoréactivité aux récepteurs 5-HT_{1A} [137, 138].

1.5.2.3. Rôle

Les récepteurs 5HT_{1A} sont impliqués dans la physiopathologie et la thérapie des troubles de l'anxiété et la dépression. Concernant la dépression, de nombreuses données confirment l'implication majeure des récepteurs 5-HT_{1A} présynaptiques et des études plus récentes confirment leur importance dans la réponse aux traitements antidépresseurs [139-141]. Récemment, plusieurs études révèlent que les récepteurs 5-HT_{1A} sont des cibles prometteuses pour le traitement des effets secondaires extrapyramidaux des médicaments antipsychotiques ou de la MP [142].

1.5.2.4. Imagerie TEP des récepteurs 5-HT1A

Le développement de molécules synthétiques agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} a alimenté le développement de l'imagerie PET ayant pour objectif la visualisation et l'étude de ces récepteurs *in vivo* [143-145]. La plupart des traceurs 5-HT_{1A} appartiennent aux familles structurelles développées à partir du WAY100635 ou du 8-OH-DPAT [146].

A l'heure actuelle, on ne dispose d'aucun radiotracer agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} utilisable chez l'humain *in vivo*. Plusieurs essais ont été réalisés mais sans résultats *in vivo* [146]. Le S14506, un agoniste hautement sélectif des 5-HT_{1A}, a été radiomarké au carbone 11 et au fluor 18 mais les évaluations *in vivo* n'ont pas révélés de résultats satisfaisants [147]. Une série de molécules avec une structure proche de celle du S14506 a été évaluée. Le [O-méthyl-¹¹C]2-{4-[4-7-méthoxynaphthalèn-1yl]-pipérazin-1-yl}-butyl-4-méthyl-2H-[1,2,4]triazine-3,5-dione ([¹¹C]MPT) a montré des propriétés intéressantes comme traceur agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} [148]. Bien qu'il ait montré une liaison spécifique aux régions riches en 5-HT_{1A}, une élimination lente de ce traceur chez le babouin a rendu difficile sa quantification et la caractérisation de ses propriétés de liaison (notamment la fraction libre dans le sang). Son analogue 2-méthoxyphényl ([¹¹C]MMP ou [¹¹C]CUMI-101) a révélé de meilleures caractéristiques de liaison [149, 150]. En effet, son pourcentage de fraction libre dans le sang (chez le primate) a été évalué à 59 ± 6 %. Ses métabolites radioactifs sont polaires et ne peuvent franchir la BHE. Des études *in vitro* réalisées chez l'homme en *post mortem* par technique d'autoradiographie ont été publiées en 2013 [151]. Elles révèlent que le [³H]CUMI-101 possède les propriétés pour être un bon radioligand agoniste. Mais finalement, les dernières études réalisées *in vivo* chez l'homme révèlent que le [¹¹C]CUMI-101 est en réalité un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} [152]. Actuellement, les traceurs 5-HT_{1A} utilisés avec succès en imagerie TEP sont tous des antagonistes (Figure 22)

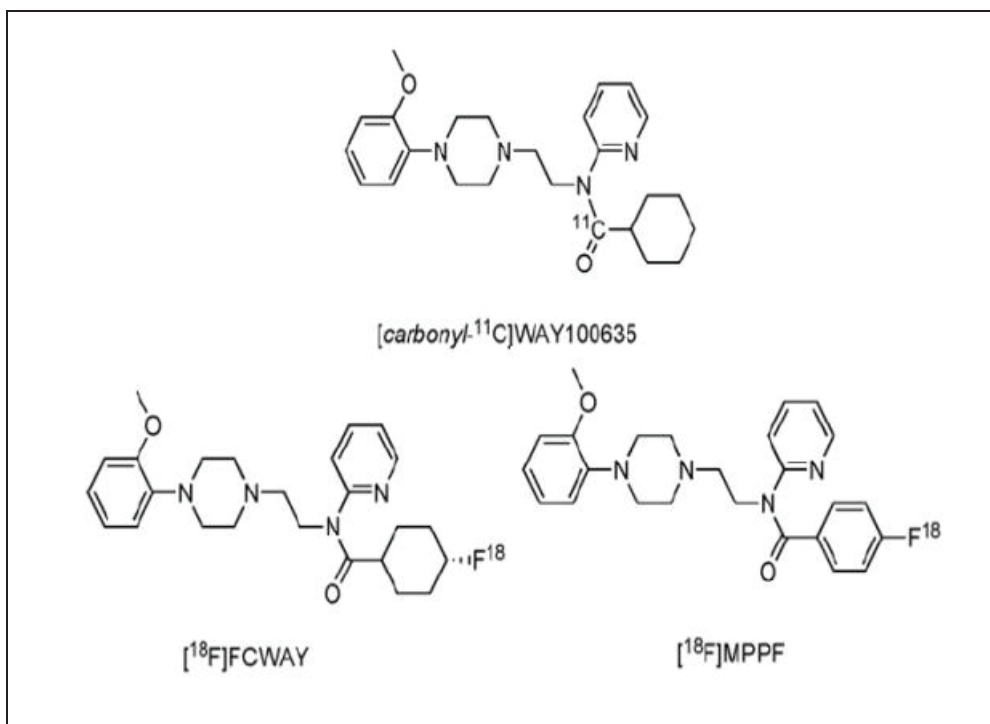


Figure 22 : Radiotraceurs des récepteurs 5-HT_{1A}

Le [O-méthyl-¹¹C]WAY100635 a initialement été identifié comme traceur *in vivo* des 5-HT_{1A} chez le rongeur et le primate, puis chez l'humain [153]. Cependant, la présence de métabolites du [O-méthyl-¹¹C]WAY100635 traversant la BHE a été mise en évidence, perturbant l'interprétation du signal TEP (fixation spécifique et fixation non-spécifique). Le site du radiomarquage a été modifié en [carbonyl-¹¹C]WAY100635, pour générer un traceur se dégradant en métabolites radioactifs polaires ne traversant pas la BHE [153]. Ce traceur a largement été utilisé dans des études physiopathologiques humaines, pour caractériser les modifications de densité de récepteurs dans différentes pathologies et conditions pharmacologiques. Il a confirmé la localisation des récepteurs 5-HT_{1A} principalement dans le système limbique (Figure 23).

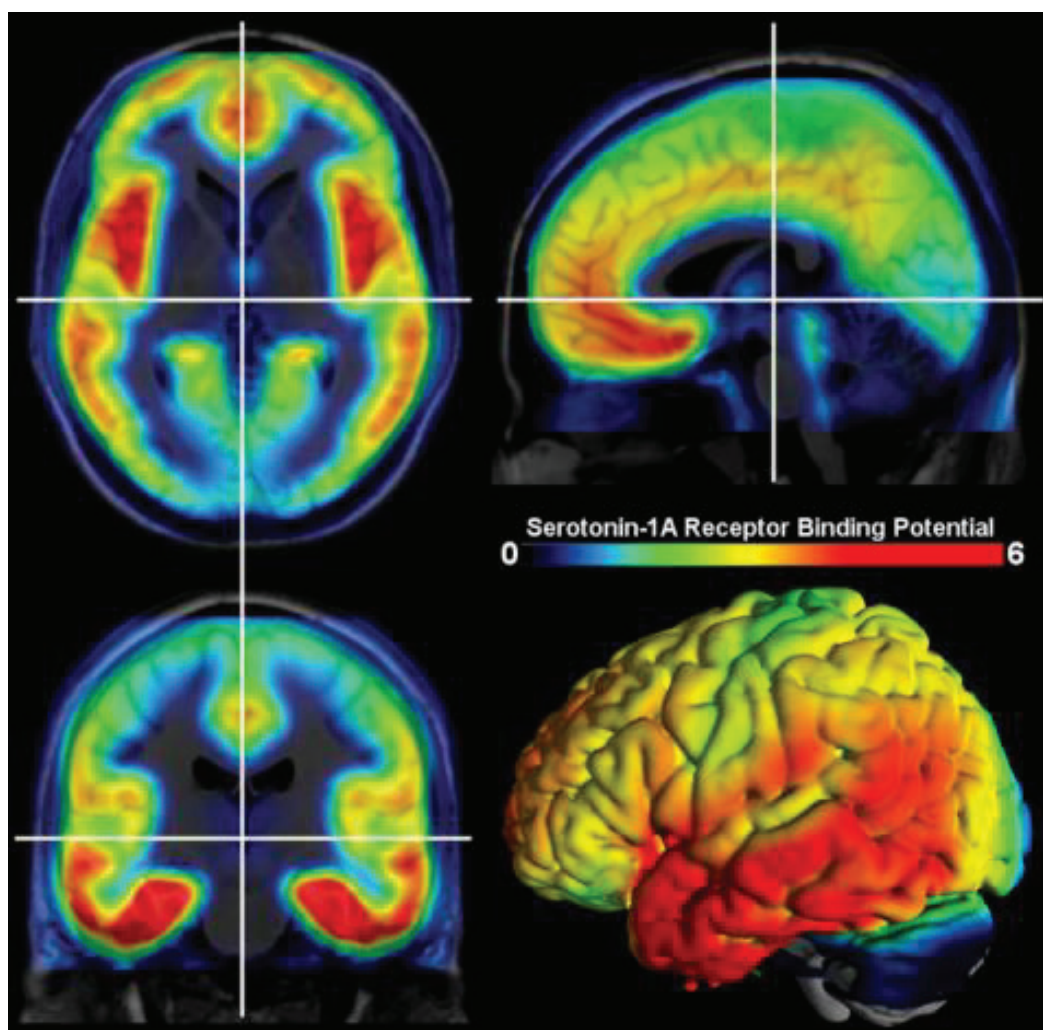


Figure 23 : Distribution des récepteurs 5HT1A dans le cerveau humain [154]

Ces images ont été obtenues par étude de la distribution du [^{11}C]WAY100635 par étude TEP basée sur l'observation de 36 sujets sains. Les plus fortes densités peuvent être observées dans les aires corticales frontales et temporales, en particulier au niveau du cortex cingulaire et du cortex entorhinal ainsi que dans l'hippocampe et la région du raphé. De plus faibles densités sont détectées au niveau du cortex occipital.

Néanmoins, la haute affinité du [^{11}C]WAY100635 pour les récepteurs 5-HT_{1A}, a mis fin aux études de compétition entre traceur et ligand endogène [155]. C'est pourquoi l'intérêt des radiochimistes s'est porté sur de nouveaux dérivés présentant une bonne sélectivité mais une affinité moyenne pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Par exemple, la phényl-pipérazine iodée p-MPPI, a montré une affinité *in vitro* évaluée avec un K_i de $3,3 \pm 0,8$ nM chez le rat [156]. Le p-MPPF s'est avéré être un ligand très sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} pré

et post-synaptiques [157]. Son analogue tritié (le [^3H]MPPF) a été évalué *in vivo* et a révélé une affinité importante et sélective vis à vis des récepteurs 5-HT_{1A} (constante de dissociation $K_d = 3,4 \pm 0,12$ nM et $B_{\text{max}} = 145$ fmol.mg⁻¹ de protéines sur homogénats membranaires d'hippocampe de rat) [158]. Ces résultats ont encouragé le marquage du MPPF par un isotope émetteur de positons, le fluor 18 [159]. La procédure de radiomarquage, basée sur une substitution aromatique nucléophile du précurseur nitro, a été optimisée par Le Bars *et al.* [160]. Une première caractérisation par autoradiographie *ex vivo* sur cerveau de rat a montré une pénétration rapide du [^{18}F]MPPF dans toutes les structures cérébrales, suivie d'une décroissance rapide de la radioactivité. Les cinétiques de décroissance ont été variables selon les structures, avec des vitesses plus élevées au niveau du striatum, du cervelet et dans les régions corticales et plus lentes dans les régions reconnues riches en récepteur 5-HT_{1A}, telles que l'hippocampe [161]. La portion de [^{18}F]MPPF distribuée dans le cerveau représentait environ 0,05 % de la dose injectée. Les premières études en autoradiographie au [^3H]MPPF avaient révélé un marquage du cortex entorhinal, du septum latéral et du NRD. Cette distribution a été confirmée par l'étude de Plénevaux *et al.* et coïncidait avec les études immunocytochimiques réalisées auparavant [122, 161]. Ces premières études ont donc confirmé la sélectivité du [^{18}F]MPPF pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Chez l'animal anesthésié (rat et primate non humain), les études microTEP au [^{18}F]MPPF ont confirmé le marquage sélectif de l'hippocampe et du raphé dorsal [162]. Par la suite, les études précliniques de validation ont été menées chez le chat et comparées avec les données d'autoradiographie *in vitro* au [^3H]MPPF, [^3H]8-OH-DPAT et [^3H]paroxétine [160, 163, 164]. Elles ont confirmé la distribution spécifique du [^{18}F]MPPF dans les structures riches en 5-HT_{1A} (hippocampe, gyrus parahippocampique, septum latéral, cortex cingulaire et noyau du raphé). L'affinité du [^{18}F]MPPF pour les récepteurs 5-HT_{1A} ($K_d = 3,4 \pm 0,12$ nM)

proche de celle de la sérotonine ($K_i = 4,17 \text{ nM}$), a permis d'effectuer une série d'études démontrant que la fixation du [^{18}F]MPPF était sensible aux variations de la sérotonine endogène. Notre équipe a également testé les effets pharmacologiques d'antidépresseurs [163]. Une étude visant à évaluer le potentiel de liaison du [^{18}F]MPPF dans un modèle de dépression chez le primate a montré une réduction du BP dans l'amygdale, l'hippocampe, le cortex cingulaire et le noyau du raphé [165]. Aux doses d'injection administrées en TEP, les études de toxicologie chez le rat ont permis d'éliminer le risque d'effets secondaires chez l'homme. Les premières études de biodistribution du [^{18}F]MPPF ont donc pu être menées [144, 166]. Les résultats ont montré une distribution du traceur conforme à la distribution connue des 5-HT_{1A} cérébraux chez l'homme mesurée par autoradiographie [127]. De plus, les cinétiques régionales ont démontré une entrée et une sortie rapide du traceur dans le cervelet et le pons. En revanche, dans les régions limbiques cibles (hippocampe, cortex cingulaire et cortex entorhinal), l'élimination du traceur s'est révélée être retardée, atteignant un pseudo-équilibre une vingtaine de minutes après l'injection du traceur [167].

1.6. Le transporteur SERT

1.6.1. Généralités

Le transporteur humain de la sérotonine est une protéine transmembranaire constituée de 630 acides aminés dont le rôle est de transporter la 5-HT à travers les membranes cellulaires [168-170]. En raison de son implication comme cible pour le traitement des troubles majeurs de dépression et d'anxiété, le transporteur SERT a fait l'objet de recherches approfondies au cours des deux dernières décennies [171]. Le transporteur SERT est situé au niveau présynaptique au niveau des neurones

sérotoninergiques et recapte la sérotonine présente dans la fente synaptique et au niveau des autres espaces extracellulaires. Le transporteur SERT est présent à des niveaux élevés dans les noyaux du raphé, du thalamus, de l'hypothalamus et du striatum. Des niveaux modérés ont été trouvés dans l'hippocampe et au niveau du cortex cingulaire. Le SERT est présent en faible quantité dans les autres aires corticales et son niveau est à peine détectable au niveau du cervelet. En raison de son rôle central dans la neurotransmission sérotoninergique, le SERT a été associé à de nombreuses fonctions différentes tant chez le sujet sain que chez les patients atteints de troubles cliniques. SERT a été lié à des différences de traits de personnalité, se traduisant par associations négatives entre les niveaux d'expression du transporteur dans différentes régions du cerveau et la présence de troubles de la personnalité [172, 173] . L'expression de SERT au niveau de l'hypothalamus a été négativement corrélée au seuil de douleur [174]. Au niveau du cortex préfrontal (CPF) droit, du noyau caudé et du CPF ventro-gauche, le niveau de SERT est corrélé positivement à la fonction cognitive de l'individu [175]. Une autre association négative entre le taux de SERT présent dans le thalamus et le niveau de stress et d'anxiété a également été décrite. [176, 177]. Des études réalisées chez des sujets atteints de troubles de l'humeur montré que le SERT jouait un rôle majeur dans la dépression ou encore les troubles bipolaires [178-180]. D'autres études ont suggéré que le transporteur SERT était impliqué dans les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) et dans la toxicomanie, spécialement celle liée à la consommation de substances agissant sur les récepteurs NMDA [181-185]. Le SERT joue également un rôle dans l'obésité [186]. Bien que l'efficacité du traitement de la dépression majeure par les ISRS est démontrée depuis longtemps, le mécanisme d'action exact est pas encore pleinement élucidé [187, 188].

1.6.2. Imagerie du transporteur SERT

Un certain nombre de ligands PET du SERT ont ainsi été développés. Parmi eux, il faut citer la famille des diarylsulfides qui inclue le radiotracer le plus utilisé pour étudier le SERT : le [^{11}C]DASB (Figure 24).

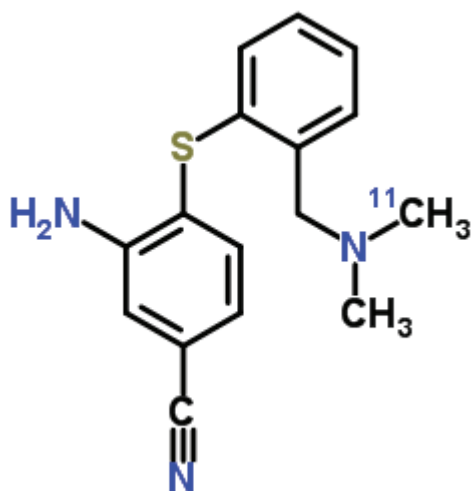


Figure 24 : Structure chimique du [^{11}C]DASB

Le [^{11}C]DASB est, à l'heure actuelle, employé dans de nombreux protocoles cliniques mais son utilisation en routine pour la clinique est impossible en raison de son marquage au carbone 11 et donc de sa demi-vie insuffisante. La figure 25 représente la distribution du SERT chez l'Homme.

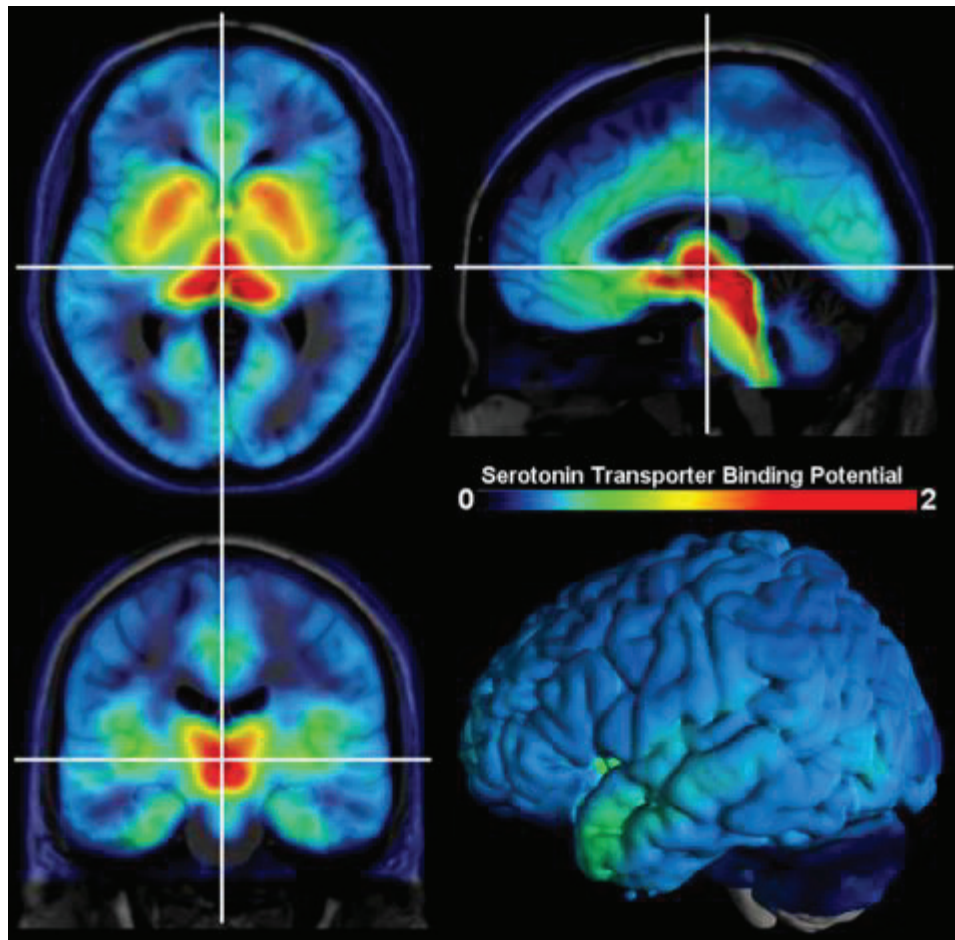


Figure 25 : Distribution du transporteur de la sérotonine SERT dans le cerveau humain [154]

Ces images ont été obtenues par étude de la distribution du $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ par étude TEP basée sur l'observation de 16 sujets sains. Les plus fortes densités peuvent être observées dans les noyaux du raphé, le thalamus, l'hypothalamus et dans le striatum. Les concentrations dans l'hippocampe et dans le cortex cingulaire sont relativement faibles. Des niveaux très faibles sont détectés dans les aires corticales.

D'autres radiotraceurs comme le $[^{11}\text{C}]\text{DAPP}$ ou le $[^{11}\text{C}]\text{MADAM}$ ont été développés et ont progressivement remplacé le tout premier traceur du SERT, le $[^{11}\text{C}]\text{McN5652}$.

Deux nouvelles molécules prometteuses marquées au fluor 18, le $[^{18}\text{F}]\text{FPBM}$ et le $[^{18}\text{F}]\text{ADAM}$ ont été récemment développées. Le $[^{18}\text{F}]\text{FPBM}$ a été évalué chez le rat et chez le singe [189, 190]. Le $[^{18}\text{F}]\text{ADAM}$ a déjà l'objet d'études chez l'homme [191, 192].

2. Sérotonine et synucléinopathies

2.1. Sérotonine et maladie de Parkinson

Pour rappel, la MP est caractérisée cliniquement par des troubles moteurs à titre de tremblements, de bradykinésie et de rigidité. Les symptômes non moteurs incluent des troubles cognitifs et des désordres neuropsychiatriques et se manifestent assez communément dissipant les croyances antérieures que la MP est uniquement caractérisée par des troubles du mouvement [193, 194]. La principale caractéristique de la MP est la perte progressive des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire [195-197]. Mais le processus physiopathologique ne se limite pas à une altération du système dopaminergique, il s'agit d'une pathologie beaucoup plus diffuse impliquant d'autres systèmes de neurotransmission non-dopaminergiques tels que la neurotransmission sérotoninergique [198-200].

La MP affecte le système sérotoninergique. Plusieurs études ont démontré l'existence d'une perte neuronale [201, 202]. La présence de corps de Lewy dans les neurones sérotoninergiques du raphé de patients atteints de MP a également été décrite [203-205].

La classification de Braak démontre que la MP commence par affecter les NDR au stade II et le complexe du raphé est entièrement touché au stade III alors que le mésencéphale et la substance noire commencent à être affectés au stade III uniquement [206, 207]. Ainsi, la perte neuronale sérotoninergique précède la perte dopaminergique et peut expliquer la présence d'une dépression avant l'apparition des troubles moteurs la dépression chez les sujets atteints de MP. Notons tout de même que la dépression chez les Parkinsoniens dépend également des autres systèmes de neurotransmissions comme le

système dopaminergique et noradrénergique dans les structures limbiques. L'altération de ces structures est connu pour être corrélé avec la sévérité de la dépression dans la MP [208].

Des études ont essayé d'établir des corrélations entre les pertes neuronales et le phénotype clinique présenté par les patients parkinsoniens. Ces études sont peu nombreuses et le nombre de patients était relativement faible. D'autres études explorant les liens entre les manifestations cliniques et la perte des cellules neuronales dans le raphé seraient nécessaires. La perte neuronale dans le NRD dorsal semble plus grave chez les sujets déprimés que chez les non-déprimés parkinsoniens mais aucune différence n'a été constatée entre patients parkinsoniens déments et non déments, psychotiques et non-psychotiques ou akinéto-rigides et patients tremblants [202, 209].

En corrélation avec la dégénérescence observée au niveau des neurones du raphé, les niveaux de sérotonine sont réduits (parfois avec un taux supérieur à 85%) dans le striatum, le globus pallidus (GP) et la substance noire (SN) [210-214]. Le noyau caudé semble être plus dénervé que le putamen en contraste avec la perte dopaminergique striatale alors que le putamen semble être plus sévèrement affecté [210, 213, 214]. Les niveaux de 5-HT striatale ne sont pas corrélés avec l'existence de dyskinésie [214]. On constate également une réduction de la concentration en 5-HT d'environ 40 à 60 % au niveau du cortex cingulaire, du cortex entorhinal et du cortex frontal ainsi que dans l'hippocampe [211, 215].

2.1.1. SERT et MP

La dégénérescence du système sérotoninergique dans la MP entraîne des modifications du niveau d'expression de SERT; principalement une réduction. Une étude SPECT a conduit à l'observation d'une diminution du niveau de SERT au niveau du thalamus chez des patients atteints de MP à un stade précoce non-traités par rapport à des sujets contrôles. Des taux thalamiques de SERT inférieurs ont été observés chez des patients atteints de MP et présentant des tremblements en comparaison à des patients non atteints par les tremblements [216]. Deux études SPECT ont examiné les niveaux de SERT chez des patients MP traités par L-DOPA. La première montre une diminution des niveaux de SERT dans le mésencéphale de patients MP par rapport au groupe témoin [217]. La seconde révèle une corrélation entre la diminution du niveau de SERT dans la partie dorsale du mésencéphale et le score UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) dont les critères de classification reposent sur l'activité mentale, le comportement et l'humeur [218, 219]. Contrairement à la première étude SPECT réalisée, une étude TEP réalisée chez des patients parkinsoniens au stade précoce début n'a pas révélé de différence significative du niveau de SERT entre les patients MP et les sujets contrôles [220]. Cette observation contradictoire pourrait s'expliquer par le fait que les patients étaient naïfs de toute thérapie dans l'étude TEP. D'autres études TEP ont montré une diminution des niveaux de SERT dans l'amygdale, le cortex cingulaire, le gyrus, l'hippocampe, l'hypothalamus, le mésencéphale, le cortex orbito-frontal, le striatum et le thalamus de patients MP comparée à des sujets témoins [221-224]. La baisse des niveaux d'SERT dans le striatum de patients MP précède la baisse des niveaux de SERT dans le mésencéphale [225]. Le niveau de SERT dans l'aire médio-frontale est corrélée négativement avec le score UPDRS part I [226]. Les niveaux de SERT sont augmentés dans le cortex préfrontal, l'amygdale, le NDR caudal, l'hypothalamus et le

cortex cingulaire des patients MP atteints de dépression [227, 228]. De faibles niveaux d'expression dans l'amygdale, le gyrus cingulaire, le striatum et le thalamus sont négativement corrélés avec la fatigue dans la MP. Les résultats des études *post-mortem* sont généralement en accord les résultats obtenus par études SPECT et TEP citées précédemment mais on note l'existence de quelques divergences. Ces résultats contradictoires pourraient être dus à l'inclusion de patients avec ou sans traitement des complications de la MP conduisant à l'obtention de population de sujets non-homogène. Ainsi, une étude autoradiographique a démontré une diminution des niveaux SERT dans le cortex frontal et le cortex temporal de patients parkinsoniens [215]. En revanche, une autre étude de liaison ne détaillant pas le tableau clinique des patients MP inclus, n'a pas montré de modifications des niveaux de SERT au sein du cortex orbito-frontal et infero-temporal des patients MP [229]. D'autres études autoradiographiques révèlent des niveaux de SERT inférieurs rencontrés dans le claustrum, le GP externe, la SN réticulée, le striatum, ainsi qu'au niveau des cortex frontaux, insulaires et visuels des patients MP [212, 230]. Une étude mesurant les niveaux de SERT striataux par technique HPLC révèle une réduction significative de ce dernier dans le noyau caudé de patients atteints de MP [214]. Enfin, une étude autoradiographique sur des sujets atteints de dyskinésie non traités par L-DOPA révèle des niveaux de SERT plus élevés dans le putamen (par rapport aux sujets traités) suggérant un nouveau rôle important du transporteur et des terminaisons sérotoninergiques dans la physiopathologie des dyskinésies tardives induites par le traitement à L-DOPA [231].

2.1.2. La modulation du transporteur SERT dans la MP

Les ISRS sont largement prescrits comme anti-dépresseurs dans la MP [232, 233]. Malgré leur utilisation généralisée chez les patients MP, il existe des données contradictoires quant à leur efficacité contre l'anxiété et la dépression et les inquiétudes persistent à propos de leur tolérance. La majorité des études réalisées avec les ISRS ont suggéré un effet bénéfique sur la dépression et l'anxiété : c'est le cas pour le citalopram [234-236], la fluoxétine [237], la fluvoxamine [238], la paroxétine [239, 240] et la sertraline [241, 242]. En revanche, d'autres études ont suggéré un manque de l'efficacité des ISRS sur la dépression et l'anxiété [243]. Cependant, il est important de noter que la majorité de ces études n'ont été pas randomisées, ni réalisées en double aveugle, ni comparées à un placebo et elles ont été menées chez un petit nombre de patients. En conséquence, en 2011, une revue de la littérature publiée par le MDS (Movement Disorders Society) a conclu que le niveau de preuve était insuffisant pour conclure à l'efficacité de cette classe médicamenteuse pour le traitement de la dépression dans la MP [244]. Depuis la publication de cet avis, une étude de phase III a démontré que la paroxétine était efficace pour le traitement de la dépression chez les sujets atteints de MP [245].

Quelques études ont suggéré que les ISRS pourraient s'avérer efficaces dans la réduction de la dyskinésie. Ainsi, sur un modèle parkinsonien de rat, traité par citalopram d'une part en aigu et d'autre part en chronique, une réduction significative des mouvements anormaux involontaires (MAI) induits par L-DOPA sans que l'efficacité du traitement par cette dernière ne soit remise en cause [246, 247]. Des traitements aigus par paroxétine et fluoxétine ont également réduit les MAI induits par L-DOPA (bien que les doses élevées de fluoxétine aient limité l'action de la L-DOPA) [246]. Des résultats similaires

ont été obtenus avec la fluoxétine mettant en évidence une réduction des dyskinésies tardives induites par le traitement par apomorphine (sans réduction de l'effet clinique de l'apomorphine) [248]. L'effet des ISRS sur le syndrome parkinsonien reste un sujet controversé. Ainsi, le citalopram a été décrit à la fois comme aggravant et améliorant les troubles parkinsoniens. De même, la fluoxétine a aggravé certains symptômes de la MP mais n'a eu aucun effet sur d'autres [249-252]. Ce phénomène a été également constaté avec la fluvoxamine et la paroxétine alors qu'aucun effet sur l'invalidité parkinsonienne a été noté avec la sertraline [241, 242]. L'impact réel des ISRS sur la gravité des symptômes parkinsoniens reste incertain et la plupart des études citées précédemment suggèrent que les ISRS pourraient aggraver le tableau clinique de façon anecdotique. En conséquence, une métaanalyse incluant 2064 sujets MP a démontré que les anti-dépresseurs n'avaient pas d'effet sur le score UPDRS part III [253]. Des études précliniques, réalisées au cours de ces dernières années, ont évoqué la possibilité que les ISRS pourraient exercer un effet neuroprotecteur. Ainsi, l'administration de fluoxétine à un modèle de rat MP 6-OHDA pendant 14 jours a inversé le phénomène de réduction de la prolifération cellulaire dans la zone sous-granulaire que l'on rencontre chez les rongeurs MP [254, 255]. La fluoxétine a également pallié à la réduction de la neurogenèse hippocampique chez un modèle de souris surexprimant l' α -syn A53T [256]. L'administration de fluoxétine pourrait jouer un rôle protecteur chez la souris contre la toxicité induite par le 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine (MPTP) [257].

2.1.3. Récepteurs 5-HT_{1A} et MP

La dégénérescence du système sérotoninergique chez les patients MP entraîne une modification du niveau d'expression des récepteurs de 5-HT_{1A}. Des études réalisées *in vivo* en TEP et *post-mortem* ont suggéré que les récepteurs 5-HT_{1A} étaient impliqués à la fois dans les troubles moteurs et les troubles non moteurs de la MP. Ainsi, une étude TEP a révélé une diminution du niveau d'expression des récepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex cingulaire antérieur, l'insula et le noyau caudé chez des patients parkinsoniens en comparaison à des individus contrôles. [258]. La même étude révèle également une diminution du niveau d'expression du récepteur 5-HT_{1A} dans l'amygdale, le cortex orbito-frontal et le cortex temporal chez les patients MP déprimés par rapport aux patients non-déprimés [258]. Une autre étude TEP met en évidence une réduction du niveau d'expression du récepteur 5-HT_{1A} dans le mésencéphale et l'existence d'une corrélation entre la gravité des tremblements et la réduction du niveau d'expression de ces récepteurs [259]. Inversement, une étude autoradiographique (dont le tableau clinique des patients n'est pas détaillé) met en évidence une augmentation du niveau d'expression des récepteur de 5-HT_{1A} dans le cortex temporal inférieur et le cortex orbito-frontal de patients parkinsoniens [229]. Des résultats similaires ont été retrouvés dans une autre étude autographique réalisées sur sujets MP traités par L-DOA [260]. Une autre étude *post-mortem* a révélé une sur-expression des récepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex temporal de patients MP déprimés atteints de démence par rapport à des sujets témoins [261]. Aucune étude sur l'expression du récepteur récepteurs 5-HT_{1A} chez les sujets atteints de dyskinésies n'a été réalisée. Huot et al. ont publié en 2006 une étude portant sur un modèle de macaque MPTP qui a révélé une augmentation des 5-HT_{1A} dans les couches moyennes du cortex moteur et pré-moteur et une diminution de leur expression au niveau des couches externes malgré la prescription ou non d'un traitement par L-DOPA

[262]. A ce stade, il est important de souligner que l'étude des phénomènes de régulation des récepteurs 5-HT_{1A} est plus complexe que l'évaluation du nombre absolu de ces récepteurs. En effet, les récepteurs 5-HT_{1A} sont doués d'une capacité de désensibilisation. Ce phénomène intervient lors de l'administration aiguë et chronique d'anti-dépresseurs et se produit par l'intermédiaire de l'internalisation du récepteur ou d'un phénomène de découplage de la protéine G [263]. Ce phénomène de désensibilisation semble affecter uniquement les autorécepteurs (les hétéro-récepteurs semblent ne pas se désensibiliser). La relation entre la MP et la désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} reste à étudier.

2.1.4. La modulation du récepteur 5-HT_{1A} dans la MP

2 1.4.1. Études pré-cliniques

Les agonistes 5-HT_{1A} ont été largement étudiés pour leur efficacité sur la dyskinésie. Sur le modèle de rat MP 6-OHDA, l'administration systémique de l'agoniste de 8-OH-DPAT, de même que l'injection intra-cérébrale, réduit les MAI post-induits par L-DOPA [264]. De même, cette même administration (locale ou systémique) de 8-OH-DPAT réduit ces troubles post-induits par l'agoniste D₁ SKF-81297 et par l'agoniste D₂ la quinpirole [265, 266]. La buspirone (agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A}) produit les mêmes effets chez la souris et le rat [267, 268]. Les agonistes 5-HT_{1A} pourraient également réduire le processus primaire conduisant au développement de la dyskinésie. Ainsi, une administration *de novo* de 8-OH-DPAT ou de buspirone, en association avec le CP-94253, un agoniste sérotoninergique des récepteurs 5-HT_{1B} au modèle de rat MP 6-OHDA ont augmenté le délai d'apparition des MAI [268]. Cependant, la buspirone, administrée à haute dose, modifie les résultats du test comportemental de la tige tournante (Rotarod test) traduisant un effet délétère sur l'action

anti-parkinsonienne de la L-DOPA [269]. Le flésinoxan (agoniste 5-HT_{1A}) et le piclozotan (agoniste partiel) ont été décrits comme présentant un effet positif sur la réduction des MAI induit par L-DOPA sur le modèle de rongeur 6-OHDA [270]. L'administration par voie systémique ou l'injection locale du sarizotan (agoniste non sélectif des récepteurs 5HT_{1A}) présente lui aussi les mêmes effets bénéfiques [271]. Sur un modèle de ouistiti MPTP, le 8-OH-DPAT a réduit la dyskinésie induite par L-DOPA mais réduit le bénéfice du traitement par cette dernière [272]. Sur un modèle de macaque, le 8-OH-DPAT a réduit la dyskinésie induite par le traitement par pramipexole (agoniste dopaminergique) [272]. Toujours chez le macaque (modèle MPTP), de faibles doses de sarizotan ont réduit de façon significative la dyskinésie tardive induite par L-DOPA. [273]. A doses plus élevées, le bénéfice de la DOPA thérapie n'est pas conservé.

2.1.4.2. Études cliniques

Cinq essais cliniques évaluant l'efficacité de la buspirone chez des sujets MP ont été publiés mais un seul d'entre eux était une étude randomisée, avec double insu et contrôlée par placebo [274]. Selon Hammerstad *et al.*, la buspirone n'a pas réduit la gravité de la dyskinésie alors que d'autres études ont montré le contraire [275, 276]. La buspirone présente des propriétés anxiolytiques chez les patients MP [275-277]. La mirtazapine (agoniste non sélectif des récepteurs 5HT_{1A}) a réduit la dyskinésie chez des patients MP et a contribué à la réduction des tremblements [278, 279]. Des études de phase II évaluant l'efficacité du sarizotan sur la réduction de la dyskinésie induite par L-DOPA a montré des effets bénéfiques de cette molécule [280]. Cependant, cette efficacité anti-dyskinétique de n'a pas pu être reproduite dans une autre étude de phase II et des doses plus élevées ont entraîné une altération de l'efficacité de la L-DOPA [281]. Dans deux études de phase III, le

sarizotan a significativement réduit la dyskinésie des patients MP par rapport à l'état basal et on peut noter l'absence d'une efficacité supérieure au placebo. L'efficacité anti-dyskinétique de l'agoniste sélectif 5-HT_{1A}, la tandospirone, a été évaluée chez 10 sujets MP dyskinétiques. Une réduction de la dyskinésie a été observée chez la moitié des patients mais l'efficacité de la L-DOPA a été réduite chez 4 d'entre eux.

En conclusion, toutes ces études révèlent l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} sur la dépression, les tremblements et la dyskinésie des patients atteints de MP. Les agonistes de ces récepteurs semblent avoir un effet positif sur la réduction de l'anxiété et des tremblements. Le bénéfice de leur action combinée avec la L-DOPA et les agonistes dopaminergiques est plus controversée.

2.2. Sérotonine et autres synucléinopathies

Après avoir décrit les liens existants entre sérotonine et MP, une étude de la littérature nous amène à constater que les études s'intéressant à l'implication de la sérotonine dans les autres synucléinopathies telles de que la DCL et l'AMS sont rares.

Dans la DCL, les corps de Lewy sont présents dans le noyau du raphé dorsal et une réduction marquée de la sécrétion de sérotonine a été rapportée dans le striatum, le cortex frontal et le néocortex [282]. Une élévation de la valeur du Bmax pour le récepteur 5-HT_{1A} dans le cortex frontal chez des patients DCL a été mise en évidence en comparaison avec des sujets témoins [283]. Sharp et al. ont également démontré, dans une étude comparant dix sujets atteints de DCL à 17 patients atteints de MP à composante dépressive, une augmentation de 60 % de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} dans le cortex temporal (zone BA6) chez ces patients présentant des signes cliniques de dépression en comparaison à ceux

qui ne présentaient pas de troubles de l'humeur [261]. Une étude de distribution du [11C]DASB chez des patients DCL souffrant de dépression majeure avait révélé une fixation du traceur relativement plus élevée au niveau cortex pariétal en comparaison à des patients DLB sans troubles dépressifs [284].

Les études concernant l'implication du système sérotoninergique dans l'AMS sont quasi-inexistantes. Nous pouvons tout de même citer l'étude de Suwjin et al. qui compare le niveau d'expression de SERT chez des sujets MP à un stade précoce à des patients atteints d'AMS. Il s'agit d'une étude d'imagerie SPECT employant le [¹²³I]βCIT qui présente en plus de son affinité pour le DAT (transporteur de la dopamine), une très forte affinité pour le SERT. Cette étude ne met en évidence aucune différence significative entre les niveaux d'expression de SERT au niveau du mésencéphale entre ces deux populations [285].

PARTIE 3

METABOLISME GLUCIDIQUE ET SYNUCLEINOPATHIES

1. Le [^{18}F]flurodesoxyglucose

Le FDG, 2-[^{18}F]fluoro-2-désoxy-D-glucose, est le radiopharmaceutique le plus employé en imagerie TEP. Ce radiotraceur, dont la radiosynthèse est présentée sur la figure 26, est un analogue du glucose qui s'accumule dans les cellules qui utilisent le glucose comme source d'énergie principale. Une concentration élevée en [^{18}F]FDG s'observe dans les tumeurs dont la consommation en glucose est élevée. Chez les sujets sains, le FDG se distribue partout dans le corps et se concentre plus particulièrement dans le cerveau, le myocarde, et dans une moindre mesure au niveau des poumons et du foie. L'accumulation cellulaire de FDG se fait par des mécanismes de transport actifs qui sont en partie dépendants de l'insuline et qui, par conséquent, peuvent être influencés par l'alimentation, les conditions nutritionnelles et l'existence d'un diabète sucré. Chez les diabétiques, l'accumulation du traceur dans les cellules est plus faible à cause d'une modification de la distribution tissulaire et du métabolisme du glucose. Le FDG est transporté au travers de la membrane cellulaire de la même façon que le glucose, mais ne subit que la première étape de la glycolyse pour donner du fludésoxyglucose-(^{18}F)-6-phosphate qui reste piégé à l'intérieur de la cellule tumorale et n'est pas métabolisé davantage. Comme la déphosphorylation par les phosphatases intracellulaires est un mécanisme lent, le FDG est retenu dans le tissu pendant quelques heures (mécanisme de piégeage). Le fludésoxyglucose-(^{18}F) franchit la barrière hématoencéphalique. Approximativement 7 % de la dose injectée s'accumulent dans le cerveau au cours des 80 à 100 minutes après injection. Environ 3 % de l'activité injectée chez l'homme est captée par le myocarde en 40 minutes. La distribution du FDG dans le cœur normal est sensiblement homogène, cependant, des différences régionales pouvant atteindre 15 % sont observées au niveau du septum

interventriculaire. En cas d'ischémie myocardique réversible, une accumulation accrue de glucose a lieu dans les cellules du myocarde. Une fraction de l'activité injectée de respectivement 0,3 % et entre 0,9 et 2,4 % s'accumule au niveau du pancréas et des poumons. Le FDG se fixe également, plus faiblement, au niveau des muscles oculaires, du pharynx et de l'intestin. Une fixation musculaire peut être notée en cas d'effort récent ou en cas de tension musculaire au cours de l'examen .

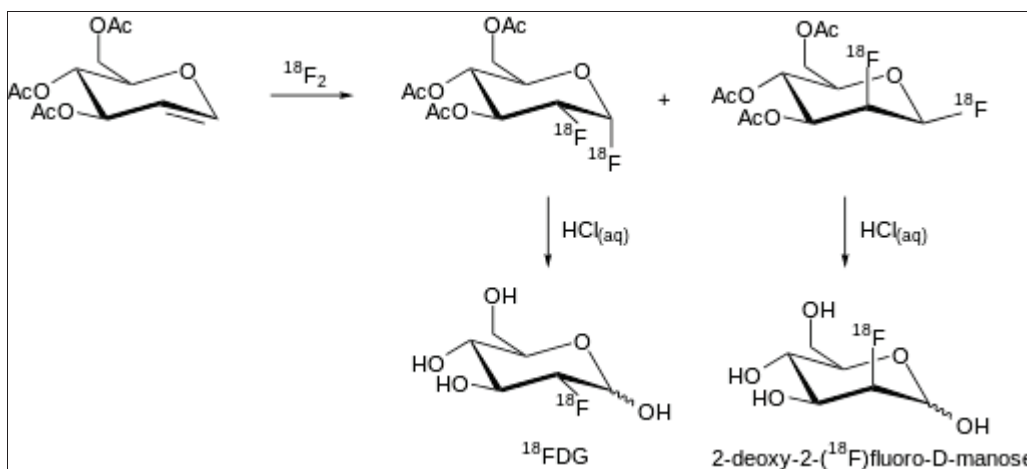


Figure 26 : Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

En clinique, le FDG est indiqué en oncologie, en cardiologie, dans les maladies infectieuses ou inflammatoires. Il possède également l'AMM dans le domaine de la neurologie où la cible diagnostique est l'hypométabolisme du glucose en phase interictale et la localisation des foyers épileptogènes. Dans le domaine de la recherche, le FDG est utilisé pour explorer les pathologies neurodégénérative. Parmi elles, nous pouvons citer la maladie d'Alzheimer, la démence fronto-temporale, la démence vasculaire, la DCL, la MP, la maladie de Huntington, la sclérose amyotrophique latérale et la maladie de Creutzfeldt-Jakob. [287]

2. Exploration du métabolisme du glucose et synucléinopathies

Des études s'intéressant au métabolisme du glucose dans les synucléinopathies se retrouvent dans la littérature. Un hypermétabolisme au niveau du pallidum et du putamen est observé dans la MP [288]. D'autres anomalies métaboliques sont observées dans la MP comprenant un hypermétabolisme thalamique et une diminution du métabolisme au niveau du cortex prémoteur, du cortex préfrontal, temporo-pariétal et pariéto-occipital ([289] [290]. La présence de déficience cognitive et de dépression chez les patients atteints de MP sont associés à des réductions du métabolisme des zones temporo-pariétales et frontales [291, 292]. le traitement avec des médicaments dopaminergiques peut normaliser les profils de consommation du glucose au niveau cérébral [293]. Une étude datant de 2014 a exploré le métabolisme du FDG chez des sujets atteints de synucléinopathies (7 patients MP, 7 patients AMS, 1 patient DCL et 6 autres patients atteints d'autres pathologies neurodégénératives). Un hypométabolisme cortical asymétrique a été observé chez la plupart des patients dans les régions frontales et pariéto-temporales [294]. Une étude s'intéressant à des patients atteints de DCL révèle un hypométabolisme du FDG principalement dans la région occipitale et un hypométabolisme moins marqué dans le cortex cingulaire postérieur et temporo-pariétal [295]. L'hypométabolisme glucidique associé à la DCL n'est pas corrélé à la distribution des protéines pathologiques agrégées. Selon une étude publiée en 2014, l'hyperfixation du [¹¹C]PIB observée en TEP est présente dans des régions différentes qui hypofixent le [¹⁸F]FDG comme le cortex occipital [296].

ETUDE EXPERIMENTALE

PARTIE 1
INTERETS ET LIMITES
PRE-CLINIQUES DU [¹⁸F]BF227

1. Objectif

Cette étude a pour objectif d'évaluer le radiotraceur BF227 radiomarké au ^{18}F sur un modèle murin original de synucléinopathie.

2. Matériels et méthodes

2.1. Radiosynthèse du ^{18}F BF227

Le radioisotope fluor 18 ou ^{18}F est produit grâce au cyclotron par la réaction (p,n) sur une cible enrichie en oxygène 18 :



Le ^{18}F obtenu est sous forme de fluorure $^{18}\text{F}^-$. Il est ensuite concentré sur une cartouche d'extraction en phase solide ce qui permet de recycler l'eau enrichie en oxygène ayant été utilisée pour la production. Le fluorure est rendu anhydre par séchage avant le radiomarquage. Le précurseur (BOTs227) est synthétisé en trois étapes à partir du 2-méthyl-1,3-benzoxazol-6-ol avec un rendement de 46 %. La substitution nucléophile fluor/tosylate est réalisée sur un automate de fluoration (Neptis®, ORA™). Le fluorure et le précurseur sont introduits dans l'automate et le mélange réactionnel est chauffé à 150°C pendant 10 minutes dans du DMSO (Figure 27).

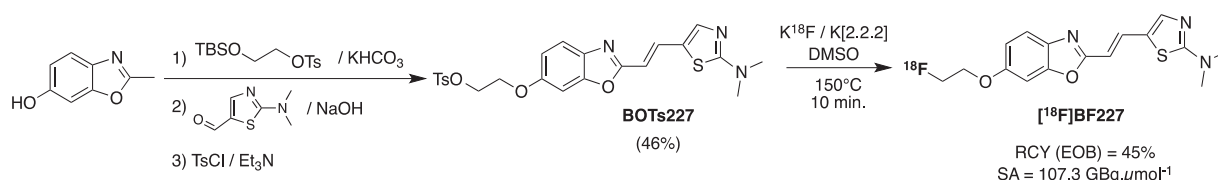


Figure 27 : Schéma de la radiosynthèse du [¹⁸F]BF227.

Après dilution avec 15 mL d'eau, le mélange réactionnel est passé à travers une cartouche C18 pour la pré-purification et le produit brut est élué de la cartouche avec 1,5 mL de méthanol. Le [¹⁸F]BF227 pur est obtenu après séparation par technique HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) avec une colonne C18 (Symmetry Prep Waters 7 μm 7,8 x 300 mm , Waters) élué avec un mélange H₃PO₄ 20mM/THF/TFA 80/20/0,1% avec un débit de 3 mL.min⁻¹ (λ = 254 nm). Le temps de rétention du composé est de 43 minutes. Pour une utilisation biologique, le produit a été formulé par des techniques d'extraction en phase solide [297]. La dilution du produit a été effectuée avec 20 mL d'eau stérile, chargée sur une cartouche C18 (Sep-Pak lumière, Waters). La cartouche chargée est ensuite rincée avec de l'eau puis élue avec 1 mL d'éthanol. Une dilution est effectuée avec une solution saline isotonique à une concentration d'éthanol de 5 %. Le contrôle qualité consiste à déterminer la pureté radiochimique et l'activité spécifique grâce à une technique d'HPLC analytique (MachereyNagel CE 250/4.6 Nucleodur 100-5 - C18ec colonne C18 ; élution avec H₃PO₄ 20 mM/THF 65/35 à un débit de 0,9 mL.min⁻¹). L'identité du [¹⁸F]BF227 est confirmée par co-injection avec un échantillon non radioactif de BF227.

2.2. Modèles animaux de synucléinopathies

Afin d'étudier l'affinité du [¹⁸F]BF227 pour les agrégats d'α-syn, nous avons développé un partenariat avec l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de

l'environnement et du travail (ANSES). L'équipe de T. Baron *et al.* a développé des modèles murins de synucléinopathies. Pour cela, ils ont utilisé une souche de souris transgénique TgM83 possédant le gène codant pour l' α -syn humaine mutée : l' α -syn A53T [298]. Cette mutation est présente dans les formes familiales de la MP et la protéine A53T possède la propriété de former des agrégats plus rapidement que la protéine sauvage [20]. Ces souris développent après l'âge de 8 mois un tableau clinique de déficit moteur. L'analyse par Western Blot des cerveaux de ces souris confirme la présence d'agrégats d' α -syn au niveau cérébral (en comparaison avec des souris témoins KO en α -syn). A partir de ce modèle, une version « accélérée » a été développée : en inoculant 20 μ L d'homogénat de cerveau de souris TgM83 symptomatique âgée de 12 à 18 mois à 1 % (poids/volume dans du glucose 5%) dans le cerveau d'une souris de même souche âgée de 7 à 9 semaines, on observe l'apparition de synucléinopathies à un stade beaucoup plus précoce que chez les souris TgM83 non inoculées [299, 300] . L' α -syn phosphorylée en serine 129 est détectable au bout de 100 jours. La distribution au niveau cérébral des agrégats d' α -syn est représentée sur la Figure 28.

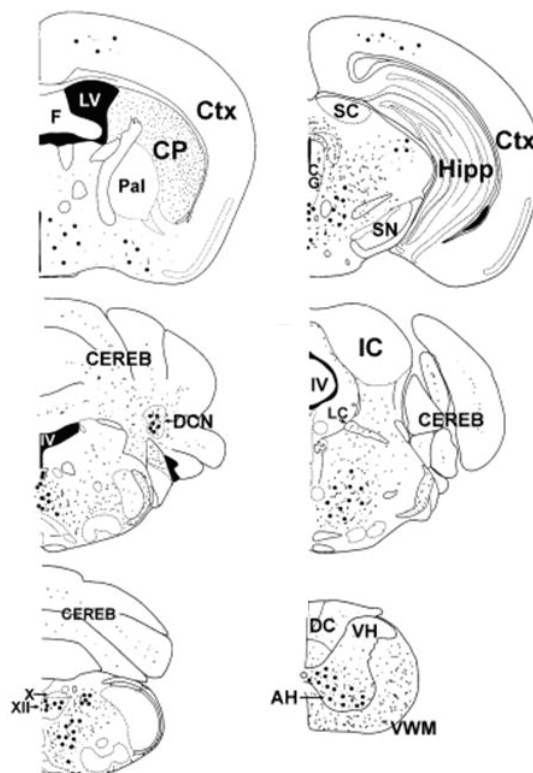


Figure 28 : Schéma de la distribution de l' α -syn-pathologique chez des souris TgM83 [298].

Des souris présentant une délétion du gène codant pour l' α -syn murine (souche C57BL/6JOLA-Hsd, HARLAN[®]) ont été utilisées comme groupe témoin dans cette étude.

Les souris ont été hébergées dans des conditions standardisées de température (22°C) et d'humidité (50 %). Le cycle jour/nuit a été maintenu à 12h/12h (lumière artificielle de 7h à 19h), l'eau et la nourriture ont été fournies *ad libitum*.

2.3. Etudes *in vitro*

2.3.1. Autoradiographie

Les souris ont été sacrifiées par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Leur cerveau a ensuite été délicatement prélevé puis congelé dans une solution d'isopentane refroidie à -29°C avec de la carboglace. Les cerveaux ainsi prélevés ont été conservés à -80°C en attente de leur cryosection. Des coupes sagittales de 30 μ m d'épaisseur ont été réalisées

sur les cerveaux congelés maintenus à -20°C, grâce à un cryostat (Leica CM1850). Les régions d'intérêts, à savoir tronc cérébral, cervelet, thalamus et hippocampe, ont été identifiées à l'aide de l'atlas stéréotaxique de souris [301]. Les coupes ont été disposées sur des lames SuperFrost® et stockées à -80°C jusqu'au jour de l'autoradiographie. Les lames sur lesquelles reposent les prélèvements cérébraux ont été remises à température ambiante 30 minutes avant le début de l'expérience. Ces lames ont ensuite été incubées pendant 30 minutes à température ambiante dans un tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH=7,5) contenant 37,08 kBq/mL de [¹⁸F]BF227. La fixation non spécifique du traceur est évaluée par ajout de BF227 en excès à une concentration de 10 µM. Après incubation, les lames ont été lavées deux fois dans un mélange tampon PBS/éthanol (1/1) pendant 1 minute puis deux fois dans de l'eau pour préparations injectables (PPI) à 4°C. Les lames ont été délicatement séchées par un léger flux d'air ambiant puis disposées dans une cassette. Un écran a été ensuite apposé contre ces lames durant 30 minutes. La distribution de la radioactivité a été visualisée grâce à la révélation de l'écran par un phospho-imager (BAS 5000, Raytest, Germany). Les images sont révélées en quelques minutes par le logiciel « Image Reader » puis les contours des régions d'intérêts sont tracées manuellement grâce au logiciel d'analyse « Multigauge » (Fujifilm, Raytest, Germany). Les densités optiques obtenues sont exprimées en psl/mm² (phospho stimulated luminescence). Les résultats sont ensuite exprimés sous la forme d'un ratio [région d'intérêt/région de référence].

2.3.2. Coloration à la thioflavine S

Après les expériences d'autoradiographie, les lames sont post-fixées à l'aide de PFA (paraformaldéhyde) à 4 %. Les coupes sont ensuite incubées dans une solution de thioflavine S à 0,05 %. Un lavage à l'éthanol puis à l'eau est réalisé. Les lames ainsi colorées

sont observées sous un microscope à fluorescence (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Germany) équipé d'un filtre FITC (fluorescein isothiocyanate) avec une longueur d'onde d'excitation de 470 ± 20 nm et une longueur d'onde d'émission supérieure à 515 nm. Les images sont capturées grâce à l'utilisation d'un appareil photo Axiocam interfacé au logiciel Axiovision 3.0 software[®] (Zeiss).

2.3.3. Immuno-analyses

Ces analyses ont été réalisées par l'ANSES. L' α -syn a été extraite du cerveau à partir du cerveau de souris ($n = 1$ souris TgM83 ; $n = 1$ souris KO α -syn) comme décrit précédemment [299, 300]. La présence d' α -syn a été mise en évidence à l'aide d'un test ELISA sandwich en plaques (MaxiSorp TM, Thermo Scientific Nunc) à l'aide d'anticorps dirigés contre l' α -syn phosphorylée au niveau du codon 129 (Millipore) et contre l' α -syn humaine (BD Biosciences). Des analyses en Western Blot sur les mêmes homogénats de cerveau ont également été réalisées.

2.4. Etudes *in vivo*

2.4.1. Imagerie microIRM

L'anesthésie a été réalisée avec un système approuvé (TEM Segal, Lormont, France). Les souris ont été placées dans une boîte d'induction hermétique avec insufflation d'un mélange de gaz isoflurane 4 % et d'air contenant 30 % d'oxygène administré à un débit d'1 L/min. Les animaux ont ensuite été placés en décubitus ventral dans un lit en plastique (Bruker Biospec Animal Handling Systems) adapté avec un système de fixation stéréotaxique permettant l'immobilisation de la tête. L'anesthésie a été délivrée via un masque adapté et

maintenue à 2 % d'isoflurane pendant toute la durée de l'examen IRM. Ce type d'anesthésie provoquant une hypothermie, la température du corps a été maintenue à $37,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ par l'intermédiaire d'un circuit d'eau thermo-régulée intégré dans le lit. Le protocole d'acquisition IRM a été réalisé *in vivo* sur un système Bruker Biospec 7 Tesla (Bruker Biospin GbmH, Allemagne) équipé d'un set de gradients de 400 mT/m d'amplitude et coordonné via une console Bruker. L'interface a été commandée par le logiciel d'acquisition et post-traitement ParaVision 5.1. Pour l'émission du signal, une antenne volumique Bruker de type cage d'oiseau (diamètre externe 112 mm, diamètre interne 72 mm) a été utilisée. La réception du signal a été réalisée grâce à une antenne de surface Bruker de type boucle (15 mm de diamètre) qui a été soigneusement centrée sur la tête de l'animal afin de cibler le cerveau. Après un repérage rapide de la zone d'intérêt, une image anatomique T2 RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) a été obtenue avec les paramètres suivants : temps d'écho (TE) : 60,28 ms ; temps de répétition (TR) : 7500 ms ; facteur RARE = 8, temps d'acquisition : 24 minutes. Quarante-sept coupes jointives de 330 μm d'épaisseur ont été réalisées pour obtenir une image complète du cerveau.

Sur les images IRM, dix régions d'intérêts (ROI) à savoir tronc cérébral, cervelet gauche, cervelet droit, matière blanche cervelet, thalamus gauche, thalamus droit, hippocampe gauche, hippocampe droit et cerveau entier ont été dessinées manuellement à l'aide de l'atlas stéréotaxique de souris [301].

2.4.2. Imagerie microPET

La caméra microTEP présente au CERMEP est entièrement dédiée à l'imagerie du petit animal. Il s'agit d'une machine préclinique PET/CT Inveon (Siemens, Germany), dont le système d'acquisition fonctionne en trois dimensions (Figure 29).

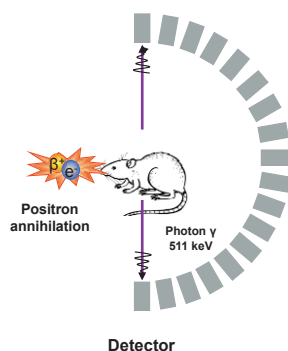


Figure 29 : Principe d'une caméra TEP dédiée à l'animal ou microTEP [302].

La souris est anesthésiée de la même façon que pour l'acquisition IRM. Un cathéter est placé dans la veine caudale de l'animal. La souris est ensuite placée en décubitus ventral sur un lit adapté (Bruker Animal Handling Systems®). L'anesthésie gazeuse est maintenue pendant toute la durée de l'examen à un taux de 2 % d'isoflurane. La fréquence respiratoire est surveillée grâce à un capteur de pression connecté à un ordinateur (Biovet, USA). L'acquisition démarre après un scanner de transmission de 10 minutes. Le $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ est injecté en bolus IV à une dose de $6,47 \pm 2,7$ MBq (min : 3,2 MBq – max : 12,02 MBq) via le cathéter. La quantité de radioactivité est mesurée sur une série de 24 « frames » de durée croissante de 20 secondes à 5 minutes, la durée totale d'acquisition est de 60 minutes. Lorsque l'acquisition est terminée, les images sont reconstruites sur un plan frontal. Les valeurs de radioactivité obtenues sont exprimées en Bq/mL pour chaque ROI dessinée.

2.4.3. Analyse des résultats

Pour l'analyse des images obtenues en microTEP, les valeurs d'absorption de radioactivité pour chaque ROI ont été exprimées en SUV (Standard Uptake Value) grâce à la formule suivante :

$$\text{SUV} = \frac{\text{Radioactivité mesurée dans la région d'intérêt (Bq/mL)}}{\text{Activité injectée (Bq) / Poids (g)}}$$

L'hippocampe a ensuite été défini comme région de référence car cette région est décrite comme étant dépourvue d'agrégats d' α -syn [298]. Les valeurs d'absorption ont été exprimées en SUVR (Standard Uptake Value Ratio) avec l'hippocampe comme région de référence :

$$\text{SUVR} = \frac{\text{SUV de la région d'intérêt}}{\text{SUV de la région de référence}}$$

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du programme GraphPad Prism (version 5.04, GraphPad Software). Les différences entre les groupes de souris transgéniques et des souris KO α -syn ont été analysées en utilisant des tests de Mann et Whitney. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives si la valeur de p était inférieure à 0,05.

3. Résultats

3.1. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$

Après collecte, le $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ est conditionné et contrôlé pharmaceutiquement (Figure 30). La présence des deux pics sur le chromatogramme s'explique par le fait que le BF227 et son précurseur s'isomérisent en solution. Le radiotraceur est obtenu avec une pureté radiochimique supérieure à 95% et une activité spécifique comprise entre 40,7 et 107,3 GBq/ μmol corrigée à l'heure de la fin de synthèse.

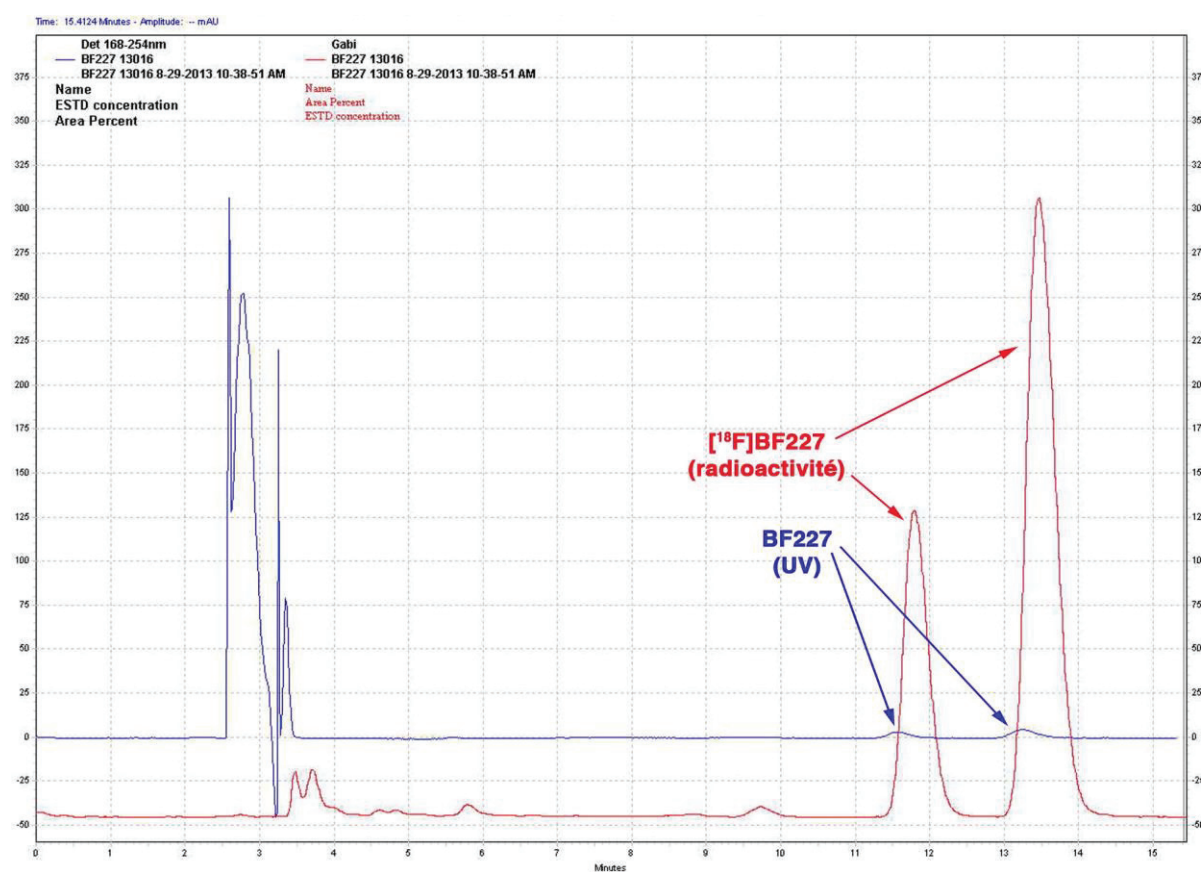


Figure 30 : Chromatogramme du contrôle qualité du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$

3.2. Etudes *in vitro*

3.2.1. Autoradiographie

La distribution du [^{18}F]BF227 a été évaluée par autoradiographie semi-quantitative sur des coupes de cerveau. Les autoradiogrammes n'ont pas révélé de différence de distribution entre le groupe de souris transgéniques et le groupe contrôle (Figure 31).

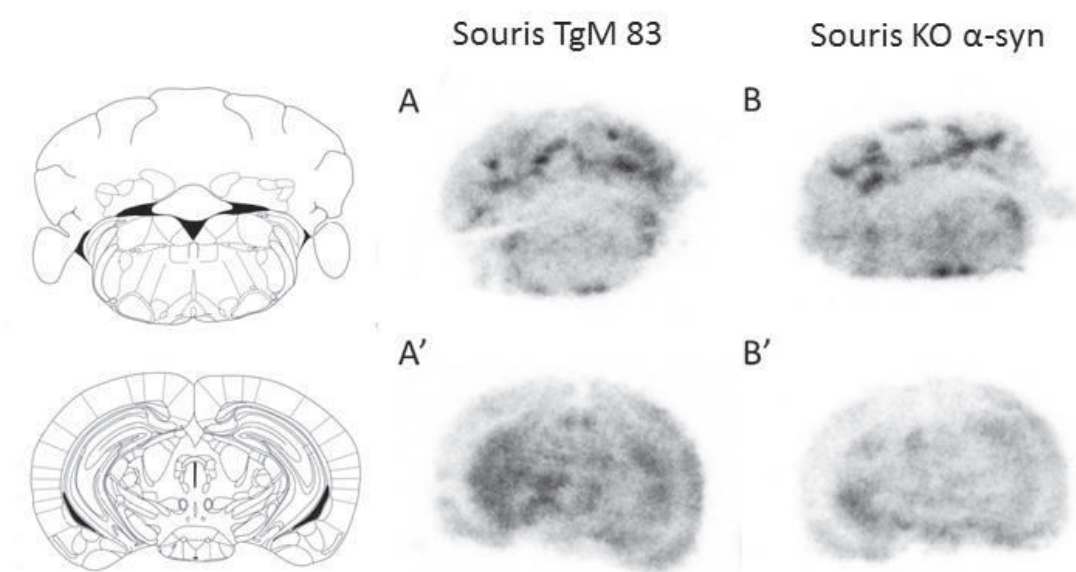


Figure 31 : Autoradiogrammes *in vitro* de coupes de cerveau de souris TgM83 (A et A') et de souris KO en α -syn (B et B') incubées avec [^{18}F]BF227.

Pour toutes les régions testées (tronc cérébral, cervelet et thalamus), aucune différence significative de distribution du traceur n'a été observée ($p = 0,89$, $p = 0,2$ et $p = 0,34$ respectivement). L'étude de compétition réalisée en incubant de la même façon les coupes de cerveau de souris (transgéniques et groupe contrôle) avec le radiotracer mais également avec du BF227 non marqué à la concentration de $10 \mu\text{M}$ n'ont pas révélé de fixation spécifique du [^{18}F]BF227 (données non présentées).

3.2.2. Coloration à la thioflavine S

La coloration à la thioflavine effectuée sur des coupes de cerveau de souris a permis de mettre en évidence la présence de structures en feuillets β plissés au niveau du tronc cérébral (+++) et du thalamus (+) des cerveaux des souris TgM83. Aucun signal de fluorescence n'a été observé au niveau du cervelet et de l'hippocampe (Figure 32). Concernant les coupes de cerveau de souris du groupe contrôle, aucun signal de fluorescence n'a été détecté quelle que soit la région cérébrale étudiée.

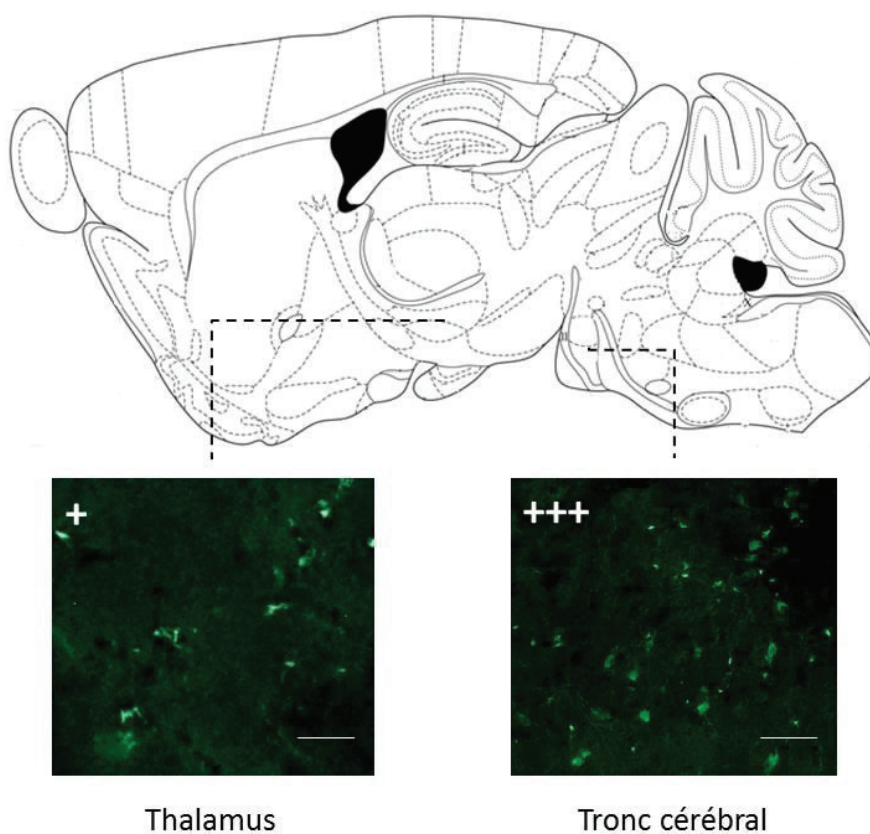


Figure 32 : Coloration à la thioflavine S de coupes de cerveau de souris TgM83. Les régions étudiées sont l'hippocampe, le thalamus, le cervelet et le tronc cérébral. Echelle 50 μ m [301].

3.2.3. Immuno-analyses

Les analyses réalisées par technique ELISA sur homogénats de cerveaux distinguent clairement les souris TgM83 des souris KO en α -syn. Les valeurs des densités optiques observées étaient de 0,174 et 0,218 (avec les anticorps LB509 et PS129 respectivement) pour les souris TgM83 contre 0,006 et 0,014 chez les souris KO en α -syn.

Les analyses en Western Blot confirment ces résultats en mettant en évidence la protéine pathologique uniquement dans l'homogénat de cerveau de la souris TgM83 analysée (Figure 33).

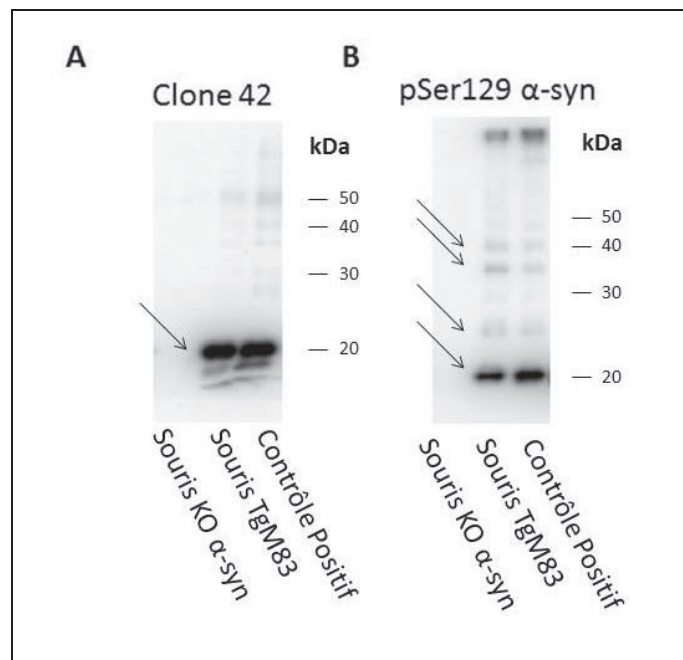


Figure 33 : Analyse en Western Blot des homogénats de cerveaux de souris. Le contrôle positif correspond à une souris TgM83 présentant des symptômes cliniques de synucléinopathies.

3.3. Etudes *in vivo*

L'analyse des images obtenues en microIRM réalisée sur une souris TgM83 a permis de dessiner les dix régions d'intérêts (ROI) : le tronc cérébral, le cervelet gauche, le cervelet droit, la matière blanche du cervelet, le thalamus gauche, le thalamus droit, l'hippocampe gauche, l'hippocampe droit et le cerveau entier à l'aide d'un atlas stéréotaxique de souris [301] (Figure 34).

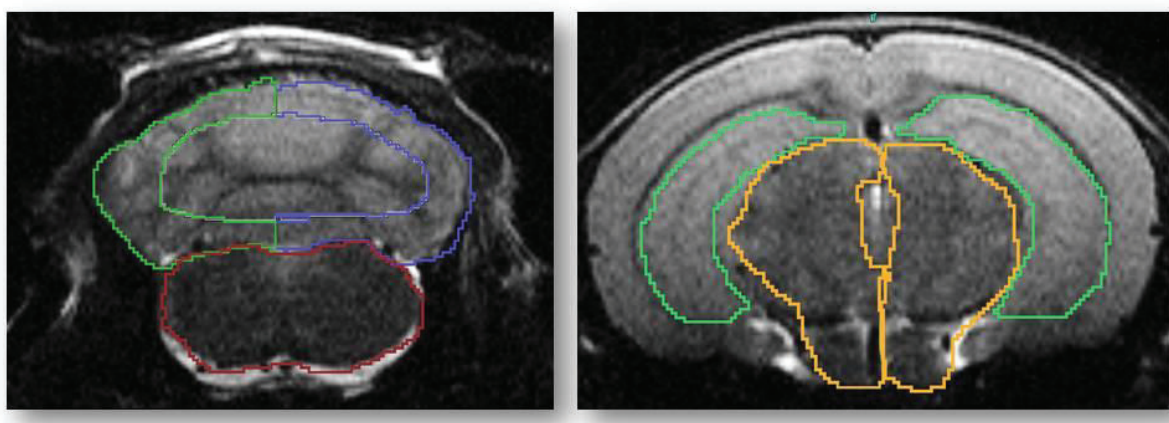


Figure 34 : Images microIRM d'une souris TgM83. Les ROI représentées sont le tronc cérébral (en rouge) et le cervelet gauche et droite (en vert et bleu) sur l'image de gauche ainsi que le thalamus (en jaune) et l'hippocampe (en vert) sur l'image de droite.

Les régions d'intérêts ainsi dessinées ont permis l'exploitation des résultats obtenus en imagerie microTEP. Au total, 9 souris TgM83 et 7 souris KO alpha-syn ont pu être scannées. L'analyse des acquisitions TEP obtenues après injection de [^{18}F]BF227 ne montrent pas de différence de fixation du traceur entre les souris TgM83 et les souris KO en α -syn (Figure 35).

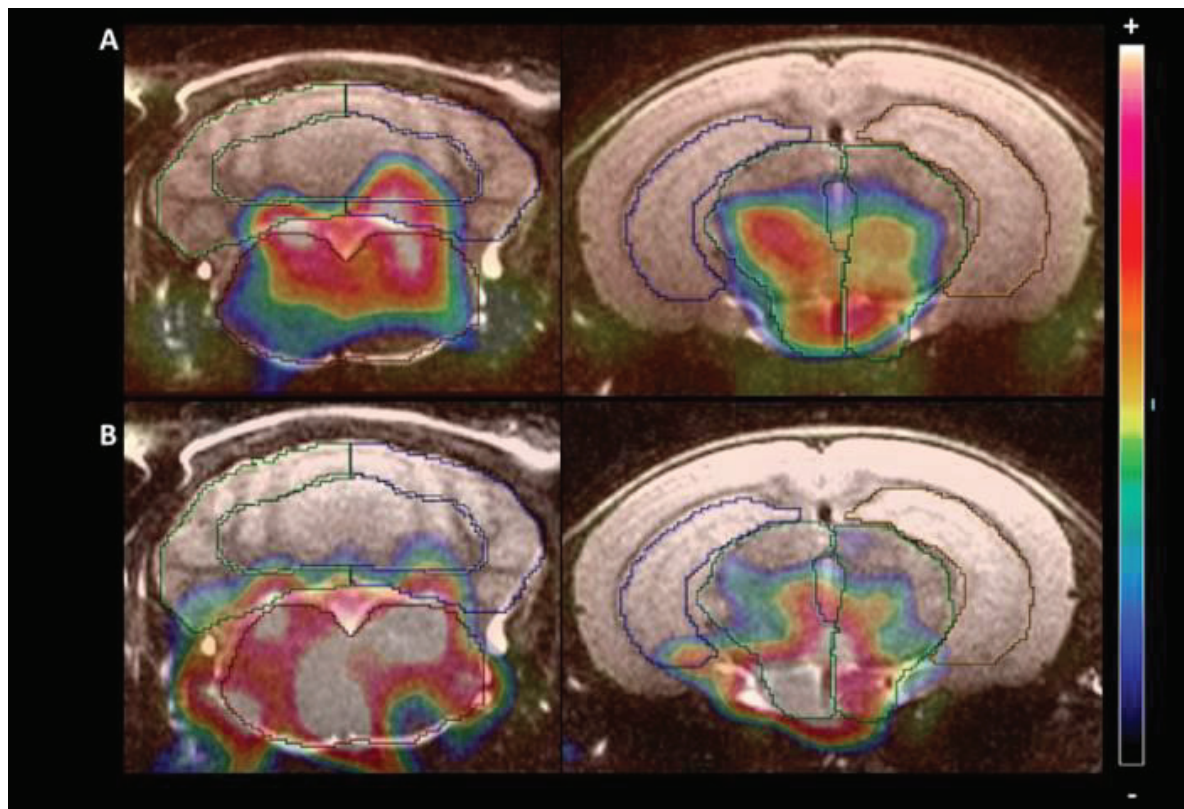


Figure 35 : Images microTEP d'une souris TgM83 (A) et d'une souris KO α -syn (B).

Chez les deux groupes d'animaux, on observe une pénétration et une clairance rapide du traceur au niveau cérébral (Figure 23). Un maximum d'absorption est observé 1,83 minutes après l'injection du [^{18}F]BF227. Les valeurs respectives sont de $7,57 \pm 2,01$ % de la dose injectée par gramme de souris pour les souris transgéniques et de $6,81 \pm 3,19$ % de la dose injectée par gramme de souris pour les souris KO en α -syn. Les ratios de fixation par région d'intérêt (exprimés en SUVR) ont été obtenus en sommant les images obtenues entre 40 et 60 minutes après l'injection du traceur.

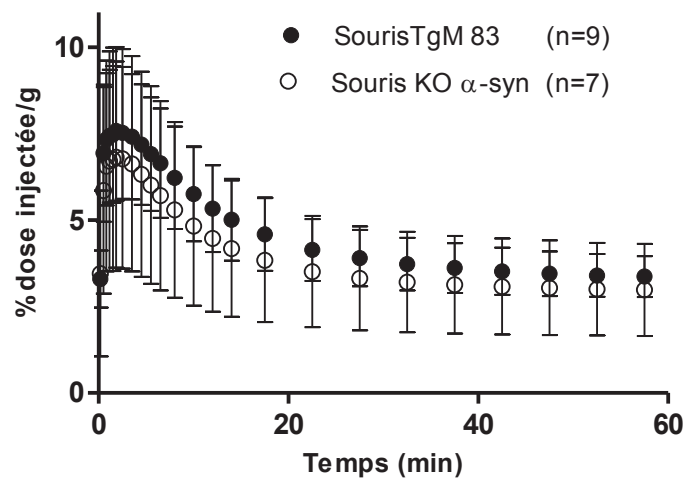


Figure 36 : Cinétique du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ au niveau du cerveau de souris TgM83 (ronds noirs, $n = 9$) et de souris KO en $\alpha\text{-syn}$ (ronds blancs, $n = 7$)

Les ratios de fixation du traceur [tronc cérébral/hippocampe], [cervelet/hippocampe] et [thalamus/hippocampe] étaient de 1,176, 0,970 et 1,127 respectivement chez les souris TgM83 versus 1,190, 1,020 et 1,127 chez les souris KO $\alpha\text{-syn}$ (Figure 36). Aucune différence significative de fixation du traceur n'a été observée entre les deux groupes de souris quelle que soit la région étudiée : tronc cérébral, cervelet et thalamus ($p = 0,84$; $p = 0,07$ and $p = 0,41$ respectivement).

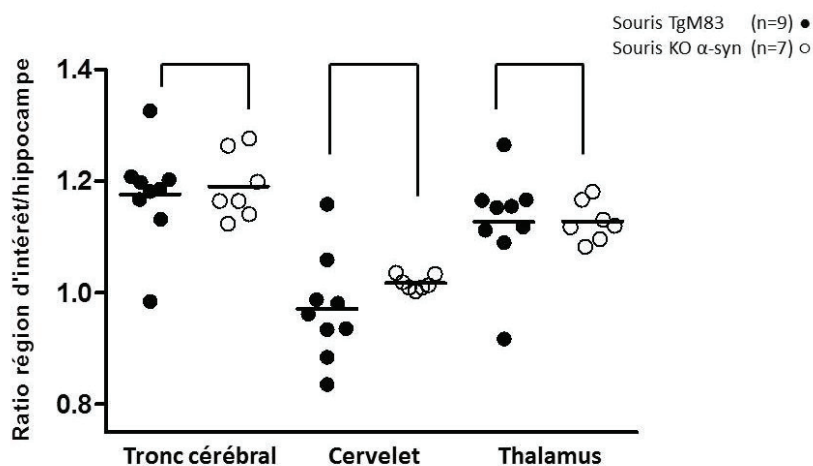


Figure 37: SUVR pour le $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ chez les souris TgM83 (ronds noirs, $n = 9$) et les souris KO en $\alpha\text{-syn}$ (ronds blancs, $n = 7$).

4. Discussion et perspectives

Plusieurs modèles de souris transgéniques exprimant l' α -syn sous sa forme sauvage (WT) ou sous sa forme mutée (A53T ou A30P) ont été développés. Parmi ceux-ci, des modèles vivants sont disponibles pour l'évaluation préclinique des agents d'imagerie de l' α -syn [10]. En partenariat avec l'ANSES, un modèle murin accéléré de synucléinopathie de type *prion-like* a été développé [299, 300]. Ce modèle a été conçu sur la base des souris transgéniques de souche TgM83 surexprimant l' α -syn humaine mutée A53T présente dans certaines formes familiales de MP. Ces souris ont été inoculées au niveau intra-cérébral avec des homogénats de cerveau de souris TgM83 âgées présentant des signes cliniques moteurs de synucléinopathies. Cette intervention a déclenché une apparition précoce des signes cliniques caractéristiques par rapport aux souris non inoculées TgM83.

Dans la première partie de cette étude, nous avons confirmé la validité du modèle accéléré de synucléinopathie en montrant la présence d'agrégats d' α -syn caractéristiques. Le test de coloration à la thioflavine S et les analyses par technique Western Blot et ELISA ont démontré la présence d' α -syn avec une conformation en feuillets β plissés, en accord avec les données de la littérature [299, 300]. Les lésions pathologiques étaient abondantes dans le tronc cérébral et plus mineures dans le thalamus, ressemblant étroitement aux inclusions pathologiques humaines présentes chez les patients atteints de synucléinopathies. Les souris C57BL/6S ayant subi une délétion du gène codant pour l' α -syn ont été choisies comme témoins à la place des souris de phénotype sauvage (WT) exprimant l' α -syn murine. Ce choix a été réalisé dans le but d'obtenir les meilleures conditions de comparaison et de supprimer le biais lié à la présence de l' α -syn murine. Les résultats obtenus *in vitro* ont renforcé le choix

de l'hippocampe comme région de référence pour l'analyse des images. En effet, la coloration à la thioflavine S a montré l'absence de protéines en structure β plissée dans l'hippocampe des souris transgéniques.

À notre connaissance, cette étude est la première à décrire des résultats d'imagerie TEP *in vitro* et *in vivo* sur un modèle de souris de synucléinopathie. Les données obtenues par imagerie microTEP ont révélé une excellente absorption du [^{18}F]BF227 au niveau du cerveau. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec ceux d'une précédente étude réalisée chez des souris WT [95].

Les résultats ont montré que le modèle animal présentait des éléments caractéristiques de synucléinopathies à savoir la présence d'agrégats d' α -syn en structure β plissés. Le [^{18}F]BF227 a montré qu'il présentait des propriétés pharmacocinétiques satisfaisantes comme radiotraceur neuronal. Cependant, malgré ces conditions favorables, l'absence de différence significative de fixation du [^{18}F]BF227 au niveau du cerveau de souris TgM83 par rapport à la souris KO en α -syn souris était inattendue. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour le manque de fixation spécifique du [^{18}F]BF227.

Premièrement, la structure de l' α -syn pourrait influencer les résultats obtenus. Il a été décrit récemment que l' α -syn pouvait être exprimée sous différents polymorphismes conduisant à une signature moléculaire différente des troubles neurodégénératifs [42]. Bien que les inclusions d' α -syn présentes chez les souris TgM83 répondent à plusieurs aspects caractéristiques des inclusions de l'homme [298], il ne peut être exclu que le [^{18}F]BF227 présente des affinités différentes en fonction de la structure de l' α -syn exprimée.

La deuxième raison pourrait être la localisation cellulaire des agrégats d'α-syn. Dans le cas des patients atteints d'AMS, les inclusions cytoplasmiques d'α-syn se localisent principalement dans les cellules oligodendrogiales [303, 304]. Le fait qu'une liaison du [¹⁸F]BF227 ait été observée *in vivo* chez des patients atteints d'AMS pourrait être en faveur d'une liaison spécifique du traceur aux inclusions d'α-syn oligodendrogiales [9]. Dans les autres synucléinopathies comme la MP et la DCL, les inclusions d'α-syn sont présentes sous la forme de corps de Lewy et de neurites de Lewy. Elles sont principalement situées dans les neurones [305]. Une étude *in vitro* a montré que le [¹⁸F]BF227 ne pouvait pas se lier à des prélèvements de patients présentant une DCL pure [8]. Ceci laisse supposer que le [¹⁸F]BF227 pourrait avoir une affinité plus faible envers les inclusions d'α-syn qui sont situées dans les neurones.

La troisième raison pourrait être liée à l'affinité du [¹⁸F]BF227 pour les agrégats d'α-syn. L'obtention d'une image TEP exploitable, et donc de bonne qualité, est fonction de la liaison de la molécule radioactive à sa cible. Cette dernière dépend du rapport de son affinité (Kd) sur la densité (Bmax) du site de liaison. Par conséquent, la plupart des agents d'imagerie du SNC utilisés comme traceurs ont un rapport Bmax / Kd supérieur à dix [4]. Selon cette règle et par le fait que le [¹⁸F]BF227 se lie aux fibrilles d'α-syn avec une bonne affinité (Kd = 9,63 nM) [8], la densité des inclusions d'α-syn pour obtenir une image satisfaisante devait être localement supérieure à 100 nM (Bmax exprimé en unités molaires), en particulier au niveau des corps de Lewy ou au niveau des sites de concentration. L'affinité relativement modeste du [¹⁸F]BF227 pour les fibrilles d'α-syn offre un ratio Bmax/Kd trop faible pour obtenir un signal en imagerie TEP satisfaisant. Si la mesure de fluorescence du BF227 au niveau de coupes de cerveaux de patients atteints de MP, de DCL et d'AMS a révélé une

liaison spécifique de la molécule, avec une co-localisation en immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre l' α -syn sous sa forme phosphorylée [9], cette étude a été réalisée en utilisant des concentrations de BF227 supérieures à 100 nM. Ces fortes concentrations sont incompatibles avec une dose traceuse de [^{18}F]BF227 nécessaire dans les études de TEP. En d'autres termes, la quantité de [^{18}F]BF227 injectée est inférieure à la quantité requise pour obtenir une fixation optimale et détectable du traceur.

Le [^{18}F]BF227 a été proposé ici comme un radiotraceur TEP potentiel des synucléinopathies en l'absence actuelle d'autres traceurs spécifiques. Nous avons évalué pour la première fois cette molécule chez un modèle murin accéléré de synucléinopathie. Les études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont montré que le [^{18}F]BF227 ne se lie pas aux agrégats d' α -syn, mettant en évidence que le [^{18}F]BF227 ne présente pas les propriétés requises pour le suivi de synucléinopathies en imagerie TEP et justifie le besoin de développer de nouveaux radiotraceurs candidats.

Dans cette optique, les futures molécules devront présenter une affinité supérieure au BF227 pour les agrégats d' α -syn. Ces molécules devront être capables de se fixer de façon spécifique aux fibrilles d' α -syn. Le BF227 n'est pas un traceur spécifique : il se lie également aux agrégats β amyloïdes présents dans la MA avec un Kd de l'ordre de 1 nM. Des traceurs candidats ont été développés en collaboration avec l'ICBMS (l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires). Leur évaluation sera détaillée dans la partie 2. Le but de ces évaluations est de développer le premier radiotraceur TEP des synucléinopathies qui pourra être utilisé en diagnostic clinique. Ainsi, suite aux études menées chez l'animal, les molécules pourront être évaluées chez l'homme. Les premiers

tests seront réalisés *in vitro* par technique d'autoradiographie grâce à des prélèvements *post-mortem* de patients atteints de synucléinopathies. A terme, un essai clinique en imagerie TEP pourra être mis en place.

PARTIE 2

EVALUATION DE NOUVELLES MOLECULES CANDIDATES COMME RADIOTRACEUR DE L'A-SYN

1. Objectif

Cette étude a pour objectif premier de mettre au point la technique de binding *in vitro* pour évaluer l'affinité de molécules candidates pour des cibles d'intérêts. Une fois cette mise au point réalisée, l'affinité de douze molécules candidates comme radiotraceur potentiel de l' α -syn sera évaluée. Il est également nécessaire d'évaluer l'affinité de ces molécules pour les fibrilles A β 1-42 en raison de leur structure très proche de l' α -syn. Le but de cette étude est de mettre en évidence une molécule possédant une fixation spécifique pour l' α -syn pathologique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Mise au point de la technique de binding *in vitro*

2.1.1. Principe

Afin de déterminer l'affinité d'une molécule pour sa cible, nous avons décidé d'employer la technique de binding sur filtres. Cette technique consiste à incuber un radiotraceur à des concentrations croissantes maîtrisées avec sa cible potentielle. Les deux composés sont mis à incuber puis le mélange réactionnel est filtré pour éliminer le radiotraceur qui est resté sous sa forme libre (non lié à la cible). La radioactivité du mélange filtré est ensuite mesurée nous pouvons déterminer quelle fraction de radiotraceur s'est fixée à la cible (Figure 38)

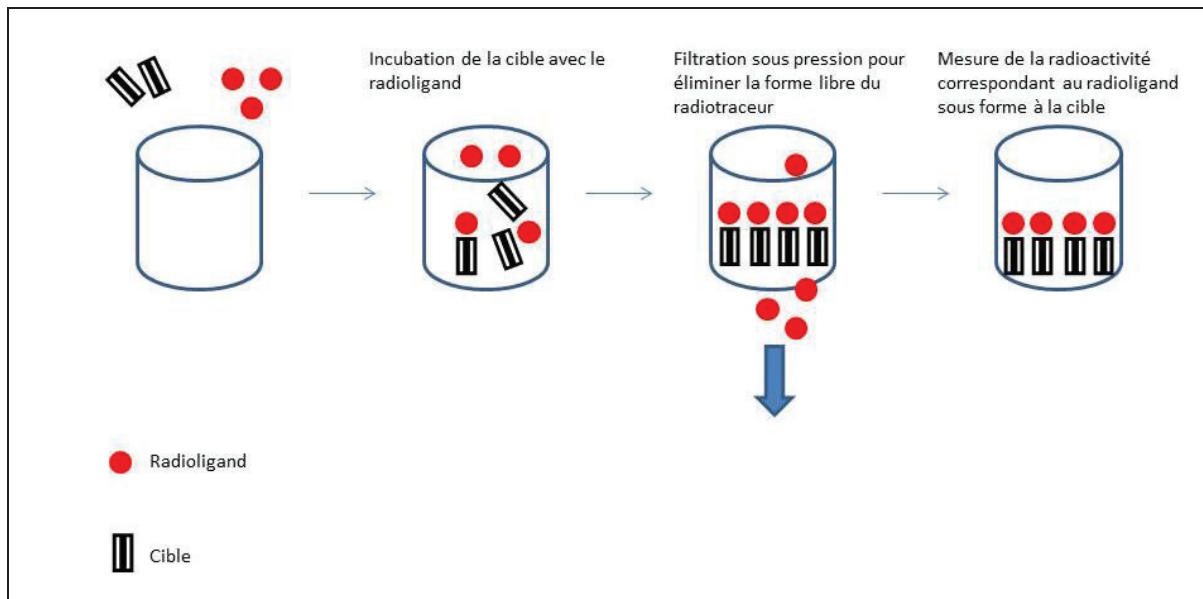


Figure 38 : Principe de l'étude de binding sur filtres

En parallèle, un mélange contenant le radiotracer, sa cible et également le radiotracer froid ou une autre molécule présentant une forte affinité pour la cible avec une concentration en excès est également mis à incuber. Ce mélange sera filtré grâce à un dispositif de filtration sous vide et la radioactivité comptée permettra de déterminer la liaison spécifique du traceur à sa cible (Figure 39)

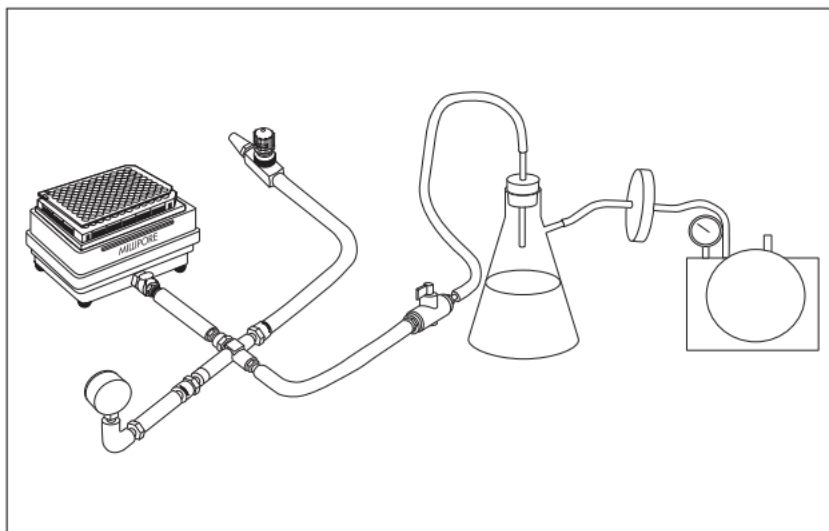


Figure 39 : Dispositif de filtration sous vide pour la réalisation de l'étude de binding sur filtres

Grâce à toutes informations (fixation totale et fixation spécifique du traceur), il est possible de calculer la constante d'affinité K_d de la molécule pour sa cible ainsi que le B_{max} qui représente le nombre de sites de liaison présents au niveau de la cible.

Pour mettre au point cette technique, nous avons choisi d'utiliser un radiotraceur dont l'affinité pour sa cible est parfaitement décrite dans la littérature. Nous avons réalisé nos expériences à l'aide du MPPF marqué au [^{18}F]. Cette molécule est un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} et présente un K_d de $3,4 \pm 0,12$ nM et un B_{max} de $135,2 \pm 4,54$ fmol/mg de protéines [306]. Concernant la cible, nous avons utilisé un homogénat d'hippocampe de rat car sa densité en récepteurs 5-HT_{1A} est très importante.

2.1.2. Préparation des homogénats d'hippocampe

Des rats mâles adultes de souche Sprague Dawley (Charles River, France) ont été utilisés dans cette expérience. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de

température (22°C), d'humidité (50%) et de luminosité (lumière artificielle alternant des cycles jour/nuit artificiels de 12 heures) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Les animaux ont été euthanasiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Le cerveau a été prélevé délicatement, rincé dans du sérum physiologique. L'hippocampe a ensuite été soigneusement disséqué et préparés aussitôt. Les homogénats ont été obtenus par broyage des hippocampes décongelés dans du tampon TBS [X10] pH=7,4 dilué au 1/5^{ème}. Les homogénats sont préparés à la concentration de 20 %. Le broyage s'effectue grâce à un riboliseur programmé avec un cycle d'une minute. Le mélange est ensuite centrifugé pendant une minute. Le surnageant est récupéré et les protéines totales sont dosées dans un automate employant la technique du Biuret. Les homogénats sont ensuite conservés à -80°C dans l'attente de leur emploi.

2.1.3. Radiosynthèse du [¹⁸F]MPPF

Le radioisotope fluor 18 ou [¹⁸F] est produit grâce au cyclotron par la réaction (p,n) sur une cible enrichie en oxygène 18 décrite dans le chapitre précédent (Etude expérimentale, partie 1, chap 2.1.).

Le ¹⁸F est rendu anhydre par séchage avant le radiomarquage. Une réaction de substitution nucléophile aromatique est réalisée en présence d'un catalyseur le Kryptofix 2.2.2, à 170°C dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant 10 minutes [160] (Figure 40). Une pré-purification de ce produit est réalisée afin d'éliminer les matières hydrophiles, puis une chromatographie liquide haute pression (HPLC) est effectuée pour purifier le radiopharmaceutique. Le [¹⁸F]MPPF est ensuite collecté, conditionné et soumis à un contrôle qualité pharmaceutique (Figure 41), qui comprend une HPLC avec détection UV et de radioactivité. Le radiotraceur [¹⁸F]MPPF est radiosynthétisé avec une bonne activité

spécifique comprise entre 37 et 111 GBq/ μmol et sa pureté radiochimique est de l'ordre de 99 %.

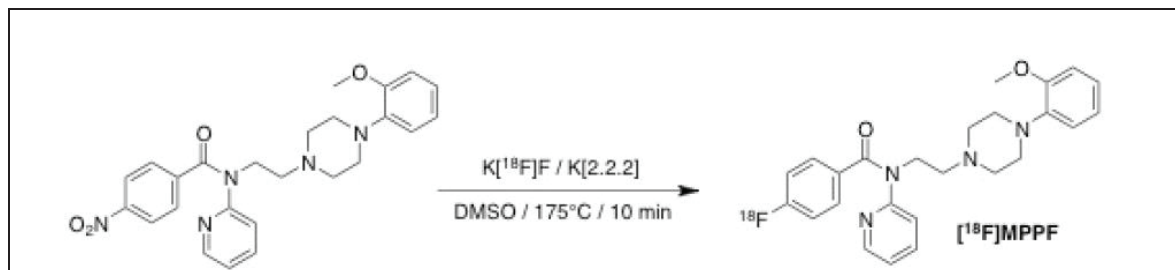


Figure 40 : Schéma de la réaction de radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$

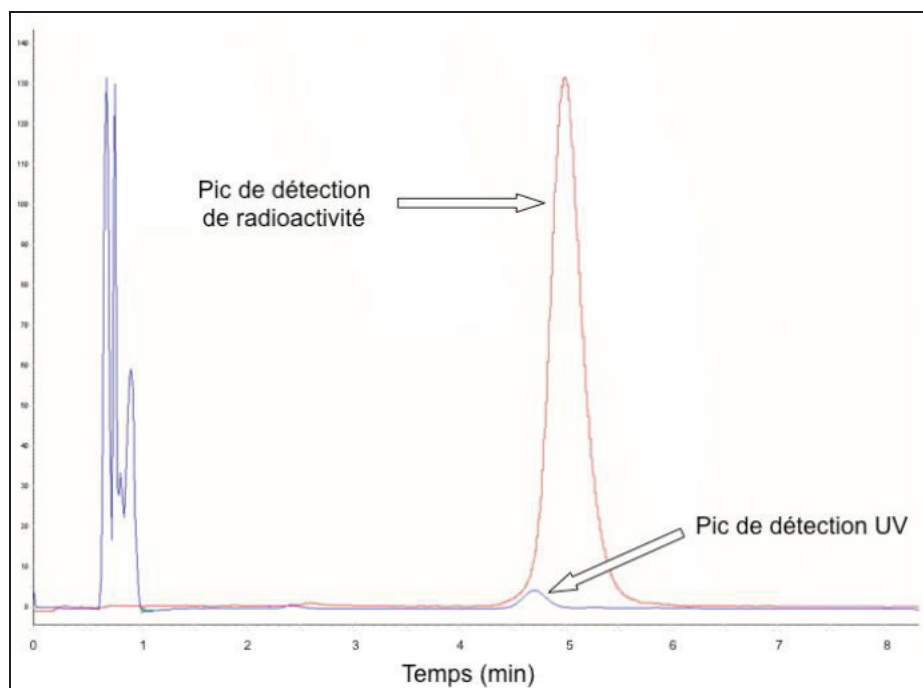


Figure 41 : Radiochromatogramme du contrôle qualité du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$

2.1.4. Binding sur filtres

La mise au point de la technique s'est basée sur les travaux réalisés par l'équipe de Tours [307, 308]. L'expérience est réalisée sur des plaques contenant 96 micropuits équipées d'un filtre de verre de type GF/B (plaques Multiscreen HTS, ref MSFBN6B10, Merck Millipore). Ces plaques sont prétraitées à l'aide d'une solution de PEI 0,1 % (PolyÉthylèneImine) deux heures avant l'incubation. La PEI est ensuite éliminée par filtration et les puits sont rincés trois fois avec 200 μ L du tampon réactionnel (tampon PBS pH=7,4 contenant 0,1% de BSA). Ensuite les puits sont remplis soit avec 50 μ L de tampon réactionnel soit 50 μ L de sérotonine à la concentration nécessaire pour obtenir une concentration finale dans le puits de 10 μ M (figure). On ajoute ensuite 50 μ L d'une solution de [18 F]MPPF avec des concentrations croissantes allant de 0,1 à 200 nM et enfin 100 μ L de la solution d'homogénats d'hippocampe représentant une quantité totale de protéines de 30 μ g par puits est ajoutée. Chaque puits est réalisé en triplicata. Ce mélange est incubé à température ambiante durant une heure. Le mélange est ensuite filtré et les puits sont rincés trois fois par 200 μ L de tampon PBS pH=7,4 (Figure 42). Les filtres de la microplaque sont ensuite découpés grâce au système d'emporte-pièce et leur radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur de radioactivité gamma (tube compteur à scintillation Auto-Gamma Packard BioScience Cobra II). Les résultats sont obtenus en coups par minute (cpm) et sont analysés par le logiciel GraphPad Prism (version 5.04, GraphPad Software).

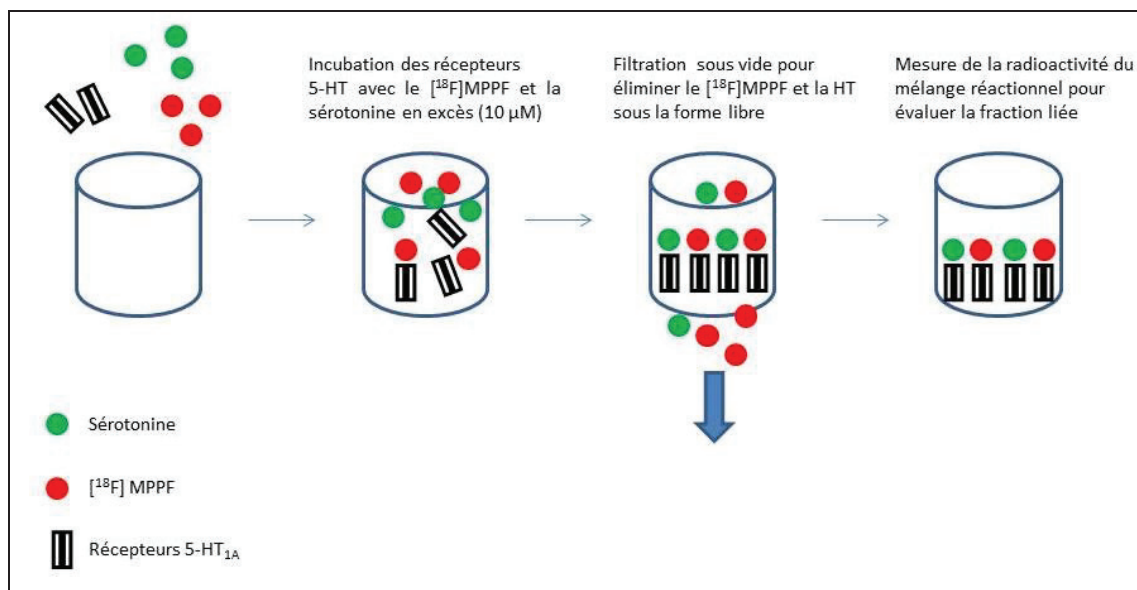


Figure 42 : Etude de la lianos non spécifique du [^{18}F]MPPF

2.1.5. Transposition de la technique aux fibrilles α -syn et A β 1-42

Une fois notre méthode validée avec le [^{18}F]MPPF, nous avons transposé cette technique pour l'étude de l'affinité de molécules sur fibrilles α -syn et A β 1-42.

2.1.5.1. Préparation des fibrilles

Les fibrilles d' α -syn et d'A β 1-42 (protéines recombinantes humaines commerciales, rPeptide) sont pré-agrégées *in vitro* à température de 37°C et sous agitation constante via thermomixeur. L'agrégation initiale de l' α -syn s'obtient par acidification et augmentation de la salinité du milieu contenant les monomères de protéines recombinantes humaines. De plus, une concentration de 200 μM de monomères et une forte agitation pendant plusieurs semaines sont nécessaires à l'obtention de ces fibrilles. L'agrégation des fibrilles d'A β 1-42 s'obtient dans des conditions moins contraignantes, à 37°C, 250 rpm (rotations par minute) et au bout de seulement quelques jours.

2.1.5.2. Caractérisation des fibrilles

2.1.5.2.1. Coloration à la Thioflavine S

Afin de s'assurer de l'agrégation des fibrilles, une caractérisation par Thioflavine S (molécule présentant une fixation spécifique aux protéines présentant des structures en feuillets β) est réalisée. Les fibrilles à tester (α -syn et A β) sont injectées à des rats témoins (Sprague-Dawley) à raison de 2,5 μ L de fibrilles α -syn à 200 μ M (0,5 nmol) au niveau du striatum droit et de 5 μ L de fibrilles A β (1 nmol) au niveau du striatum gauche. L'injection se fait par pousse seringue à un débit constant et contrôlé de 1 μ L/min et les coordonnées stéréotaxiques ont été déterminées à l'aide de l'atlas stéréotaxique de rat [309]. Suite aux injections stéréotaxiques, les rats sont euthanasiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Leur cerveau est ensuite délicatement prélevé puis congelé et conservé à -80°C. La cryosection permet ensuite d'obtenir des coupes sagittales de 20 μ m d'épaisseur que l'on dispose sur des lames SuperFrost® spécialement traitées pour des coupes de tissus congelés. La coloration à la thioflavine S se fait sur ces lames post-fixées au formaldéhyde 4 %. Les lames sont incubées dans une solution de thioflavine S à 0,0025% et après lavage dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline), elles sont observées en microscopie à fluorescence. Les zones contenant des fibrilles disposées en feuillets β seront marquées par la thioflavine S et prendront une couleur verte sous le microscope à fluorescence.

L'intensité fluorescente et l'étendue des zones colorées par la thioflavine S permet une évaluation de la quantité de cible disponible sur les coupes de cerveau et permet de confirmer la conformation en feuillets β des fibrilles d' α -syn et d'A β .

2.1.5.2.2. Caractérisation par microscopie électronique à

transmission (MET)

La MET est employée pour détecter la présence de fibrilles. Trois μL de la solution de fibrilles d' α -syn et d'A β (C=200 nM) ont été absorbés sur des grilles de nickel de 200 mesh revêtues de Formvar-C pendant 2 minutes à la température ambiante. Un papier filtre a été ensuite appliqué sur le bord de la grille pour absorber le liquide restant. Ensuite, 3 μL d'acétate d'uranyle dilué à 3% dans de l'eau déminéralisée et distillée ont été déposés sur la grille pendant 1 min, l'excès est évacué et la grille sèche à l'air avant l'examen à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Jeol JEM 1400, Tokyo, Japon) fonctionnant à 80 kV équipé d'une caméra numérique (GATAN Orius 600, Evry, France). Les images ont été traitées par Digital Micrograph.

2.1.5.3. Binding sur filtres

De la même façon que décrit précédemment (chapitre 2.1.4), une solution de concentrations croissantes de [^{18}F]BF227 (gamme comprise en 0,1 et 200 nM) est incubée avec des fibrilles d' α -syn ou d'A β 1-42 à la concentration de 200 nM sur les plaques de 96 puits (Figure 43).

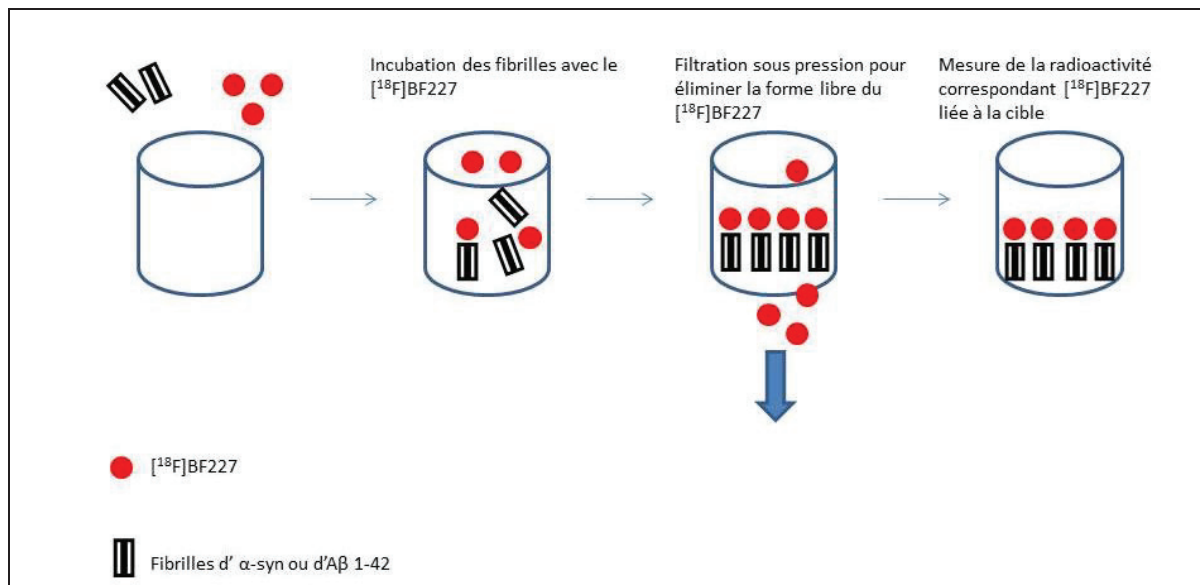


Figure 43 : Détermination de la fixation totale du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ aux fibrilles d' α -syn ou d'A β 1-42

La radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ a été décrite précédemment (Etude expérimentale, partie 1, chap 2.1.). Pour déterminer, la fixation non spécifique du traceur, ce même schéma d'incubation a été reproduit en ajoutant une solution de BF227 froid à la concentration de 50 μM dans chaque puits (Figure 44).

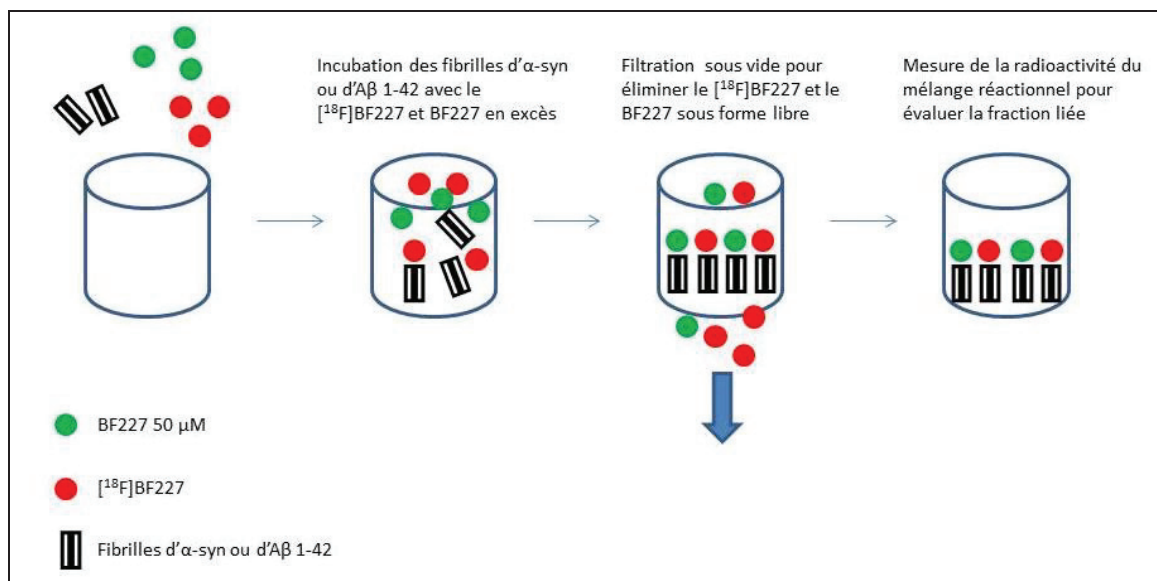


Figure 44 : Détermination de la fixation spécifique du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ aux fibrilles d'α-syn ou d'Aβ 1-42

L'expérience est également menée en triplicata et les conditions de réalisation de l'expérience sont identiques à celles décrites précédemment (chapitre 2.1.4. Binding sur filtres)

2.2. Evaluation de l'affinité de molécules candidates

Douze molécules originales ont été synthétisées par l'équipe de l'ICBMS (Figure 45). Ces molécules ont été inspirées des données de la littérature. Elles peuvent être regroupées en trois familles chimiques. La première est inspirée de la structure chimique d'antidépresseurs tricycliques, mentionnés dans un brevet [310]. Cinq composés fluorés ont été synthétisés sur la base de ce brevet. La seconde famille se compose de molécules dérivées de la structure des benzoxazoles. Cette dernière s'inspire de la structure de la thioflavine qui présente une affinité pour l'α-syn. Pour rappel, le BF227 est également un dérivé de benzoxazoles. Enfin la troisième famille est composée de ligands dérivés de benzimidazoles présentant toujours une structure plane poly-conjuguée, où la double liaison centrale a été remplacée par une triple liaison, structurellement beaucoup plus stable [311].

Ainsi, 4 premiers représentants de cette nouvelle série ont pu être obtenus. Afin de permettre un éventuel radiomarquage, toutes les molécules candidates synthétisées présentent un atome de fluor susceptible d'être remplacé par son isotope radioactif, le fluor 18, en cas d'intérêt de la molécule.

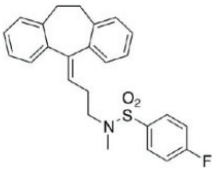
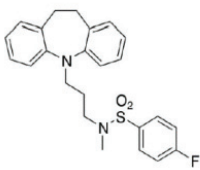
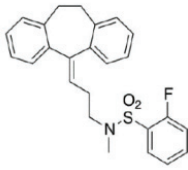
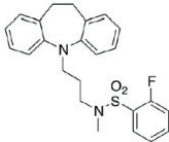
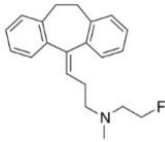
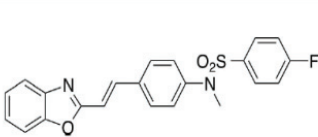
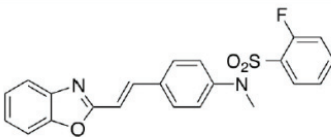
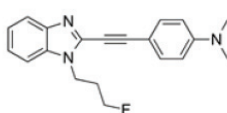
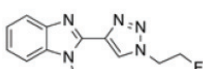
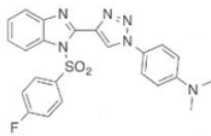
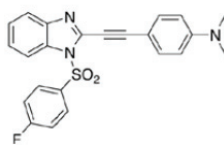
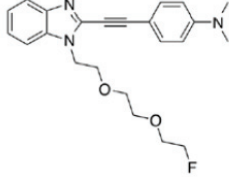
FAMILLE	MOLECULES		
Dérivés des antidépresseurs tricycliques	ZW1	ZW2	ZW3
			
	ZW4	F2CN	
			
Dérivés Benzoxazoles	ZW27	ZW31	
			
Dérivés Benzimidazoles	GG16	GG22	GG41
			
	F4SBiYB	F2PBiYB	
			

Figure 45: Molécules candidates comme radiotraceur de l' α -syn

L'affinité des molécules candidates pour les fibrilles α -syn et A β 1-42 sera évaluée de manière indirecte par la détermination de la constante d'inhibition K_i . Cette constante se

défini par la concentration de ligand nécessaire pour déplacer 50 % d'une molécule de sa liaison à la cible. Le radiomarquage des molécules au fluor 18 n'étant pas réalisable à l'heure actuelle, le K_i sera déterminé par étude de déplacement de la fixation du [^{18}F]BF227 aux protéines agrégées. Pour rappel, le BF227 présente un K_d de 9,63 nM pour les fibrilles d' α -syn et l'affinité pour le peptide amyloïde est représentée par $K_{d1} = 1,31$ nM et $K_{d2} = 80$ nM).

La détermination des constantes d'inhibition K_i sera réalisée sur les plaques de 96 puits comme décrit précédemment. Chaque puits sera incubé avec 100 μL d'une solution fibrillaire d' α -syn ou d'A β 1-42 de concentration de 200 nM, 50 μL de solution de [^{18}F]BF227 à concentration fixe proche du K_d et 50 μL de solution de ligand froid à concentrations croissantes (Figure 46). La gamme des concentrations comprend 12 points des concentrations comprises entre 0,1 et 50 000 nM. Le mélange est incubé durant une heure à température ambiante. L'expérience est réalisée en triplicata.

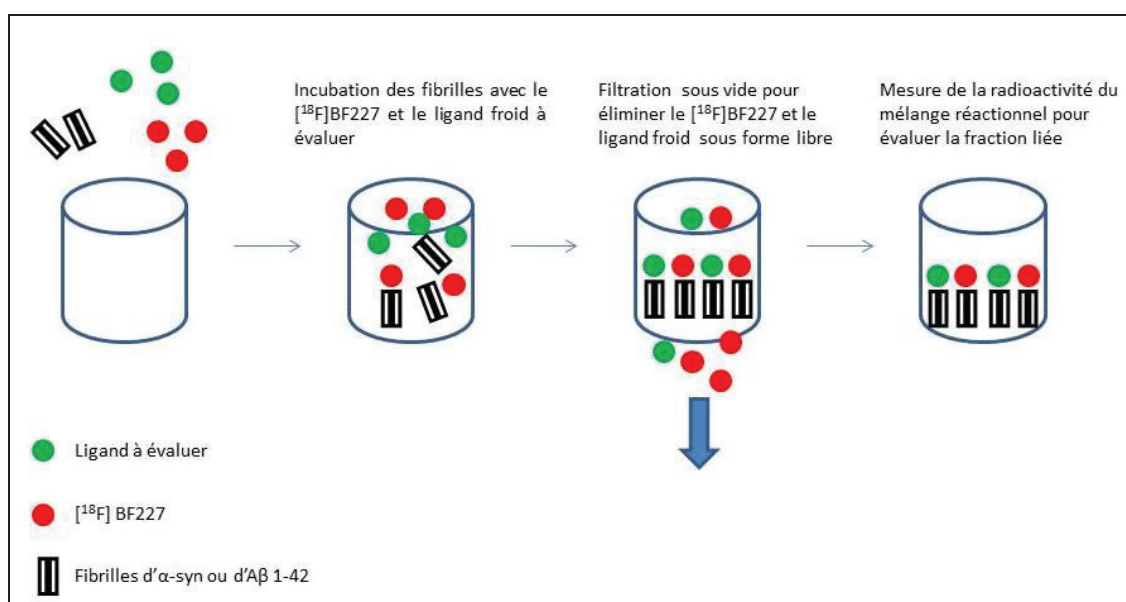


Figure 46: Principe de la technique de binding sur filtres par méthode de compétition

3. Résultats

3.1. Mise au point de la technique de binding *in vitro*

Les études de binding *in vitro* évaluant l'affinité du [^{18}F]MPPF pour les homogénats d'hippocampe ont révélé une constante d'affinité $K_d = 1,53 \text{ nM}$ avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,3596 to 2,702 nM. Le B_{max} a été estimé à 31,39 fmol/mg de protéines cérébrales totales avec un intervalle de confiance à 95% incluant des valeurs comprise entre 24,31 to 38,47 fmol/mg. La figure 47 représente les courbes de saturation de fixation totale et non spécifique et de fixation spécifique.

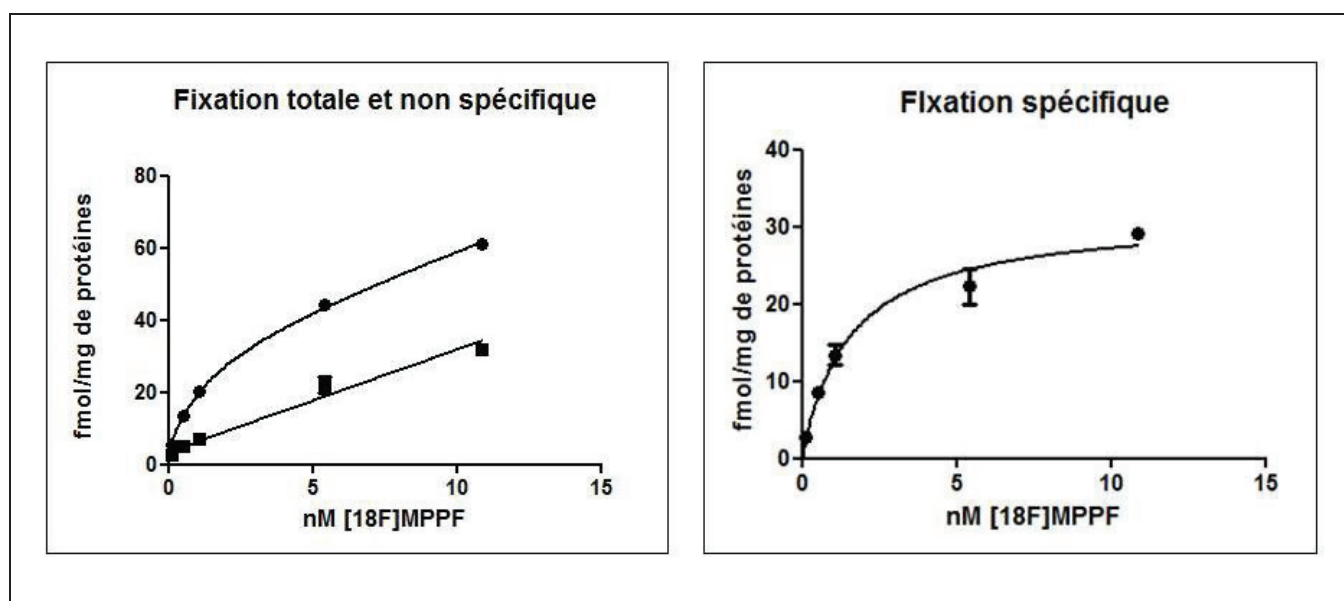


Figure 47 : Affinité du [^{18}F]MPPF pour les homogénats d'hippocampe de rat

Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. Notre méthode est donc validée et nous pouvons la transposer à l'étude de l'affinité du [^{18}F]BF227 aux fibrilles d' α -syn et d'A β 1-42.

3.2. Transposition de la technique aux fibrilles α -syn et A β 1-42

3.2.1. Caractérisation des fibrilles

3.2.1.1. Coloration à la thioflavine S

L'observation des lames présentant les coupes de cerveaux de rats injectés par les fibrilles α -syn et A β 1-42 à l'aide du microscope à fluorescence a permis de mettre en évidence la présence de protéines avec une structure en feuillets β au niveau des sites d'injection. Ces observations confirment la présence de la forme agrégée des peptides et donc l'agrégation des protéines recombinantes (Figure 48).

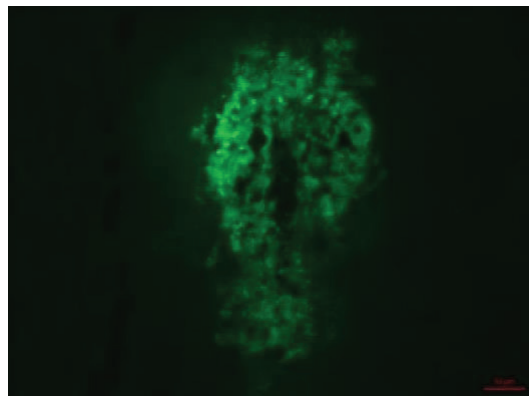


Figure 48 : Coloration des agrégats d' α -syn par la Thioflavine S

3.2.1.2. Caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET)

Les observations réalisées en MET ont permis de mettre en évidence la présence des protéines α -syn et A β 1-42 sous leur forme agrégée (Figure 49)

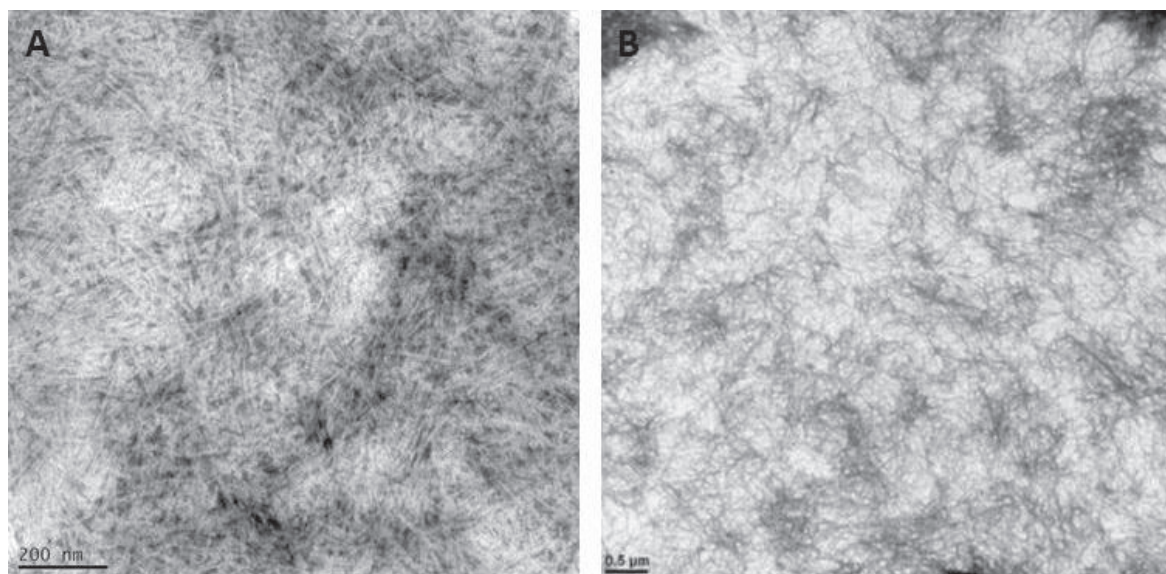


Figure 49 : Fibrilles d'Aβ 1-42 et d' α-syn observées en MET

La caractérisation des fibrilles est satisfaisante. Les protéines α-syn et Aβ 1-42 sont repliées en feuillet β plissés. Elles peuvent donc être employées pour réaliser les études de binding sur filtres.

3.2.2. Evaluation de l'affinité du [¹⁸F]BF227 pour les fibrilles d' α-syn et d'Aβ 1-42

Les études de binding *in vitro* évaluant l'affinité du [¹⁸F]BF227 pour les fibrilles d' α-syn et Aβ 1-42 ont révélé une constante d'affinité pour $K_d = 14,03$ nM pour l' α-syn avec un intervalle de confiance à 95% compris entre -29,49 to 57,55 nM. Le B_{max} a été estimé à 11,98 pmol/nmol d'α-syn avec un intervalle de confiance à 95% incluant des valeurs comprise entre 2,490 to 21,47pmol/nmol d'α-syn. Concernant l'affinité du [¹⁸F]BF227 pour les fibrilles Aβ 1-42, l'analyse réalisée par régression non linéaire montre la présence de deux sites de fixation avec un $K_{d1}=4,268$ nM dont l'intervalle de confiance à 95% est défini par les valeurs [0,0 to 844,0] et un $B_{max1} = 0,05341$ pmol/nmol d' Aβ 1-42 avec un IC 95%

compris entre -8,757 et 8,864 pmol/nmol d' A β 1-42. Le site de liaison de basse affinité du BF227 est représenté par un $Kd_2 = 50,41$ nM avec IC 95% = [-282,0 ; 382,8] et un $Bmax_2 = 3,488$ pmol/nmol d' A β 1-42 avec IC 95% = [-2,361 ; 9,338].

La figure 50 représente les courbes de saturation de fixation spécifique du radiotracer pour les deux protéines étudiées.

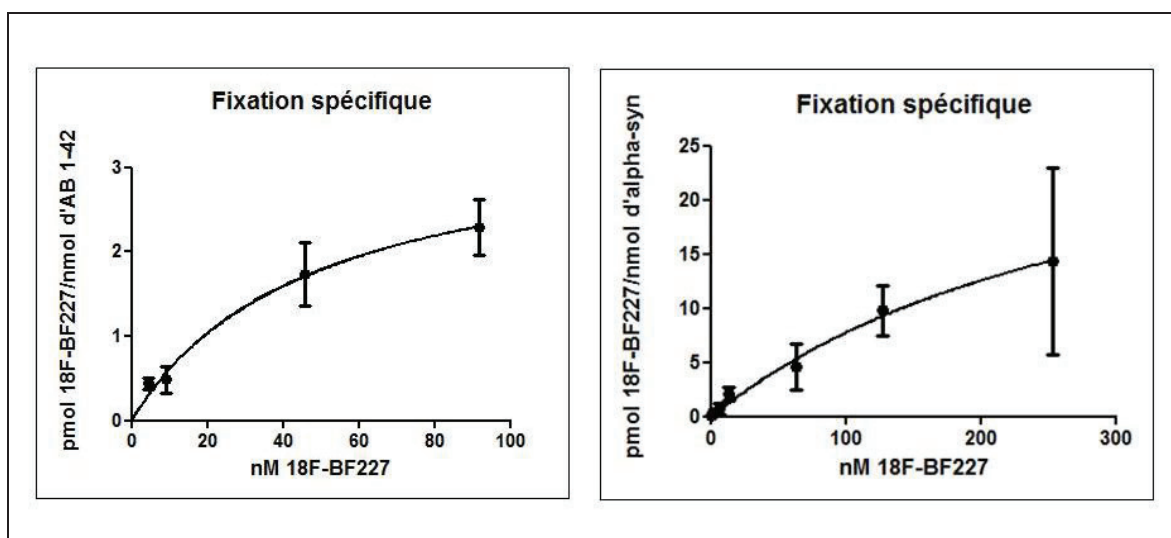


Figure 50 : Etude de binding du [^{18}F]BF227 sur fibrilles d' α -syn et d'A β 1-42

Les valeurs obtenues sont concordantes avec les données de la littérature [8]. Le BF227 peut donc être employé comme radiotracer pour déterminer les valeurs des K_i de nos douze molécules candidates.

3.4. Evaluation de l'affinité des molécules

L'affinité des douze molécules candidates pour l' α -syn et pour l'A β 1-42 ont été évaluées. L'affinité du PIB et de la thioflavine ont également été testée. Le PIB a été employé comme témoin positif car il présente une bonne affinité pour les fibrilles A β 1-42 ($K_d = 4$ nM) et pour l' α -syn ($K_d = 4,16$ nM) [312, 313]. La thioflavine T a été employée comme témoin négatif car elle présente une faible affinité pour les fibrilles d' α -syn et d'A β 1-42 avec des

constantes d'affinité de l'ordre du micromolaire mais. Le tableau IV résume les valeurs de K_i obtenues pour les douze molécules évaluées, le PIB et la thioflavine. La figure 51 présente quelques exemples de courbes de compétition obtenues par déplacement du [^{18}F]BF227 par les molécules à évaluer.

	Ki α -syn (nM)	Ki high et low A β 1-42 (nM)
ZW1	276,9	~ 0,0003899 151,3
ZW2	1972	Interrupted
ZW3	0,0251	~ 0,04401 ~ 0,002960
ZW4	44,97	~ 718,6 ~ 40,25
ZW27	224	Interrupted
ZW31	109,6	135,9 0,004068
GG16	488.4	~ 2.967 ~ 58.71
GG22	5951	NR 97,38 to 2511
GG41	91,8	4089 1227
F2CBIYB	132	~ 1678 ~ 63,82
F2CN	2554	~ 3,007e+023 494,5
F4SBIYB	263,8	409,9 ~
PIB	2,182	NR
ThT	9920	~ 31845

Tableau IV : Résultats de l'évaluation de l'affinité des molécules candidates comme traceur de l' α -syn

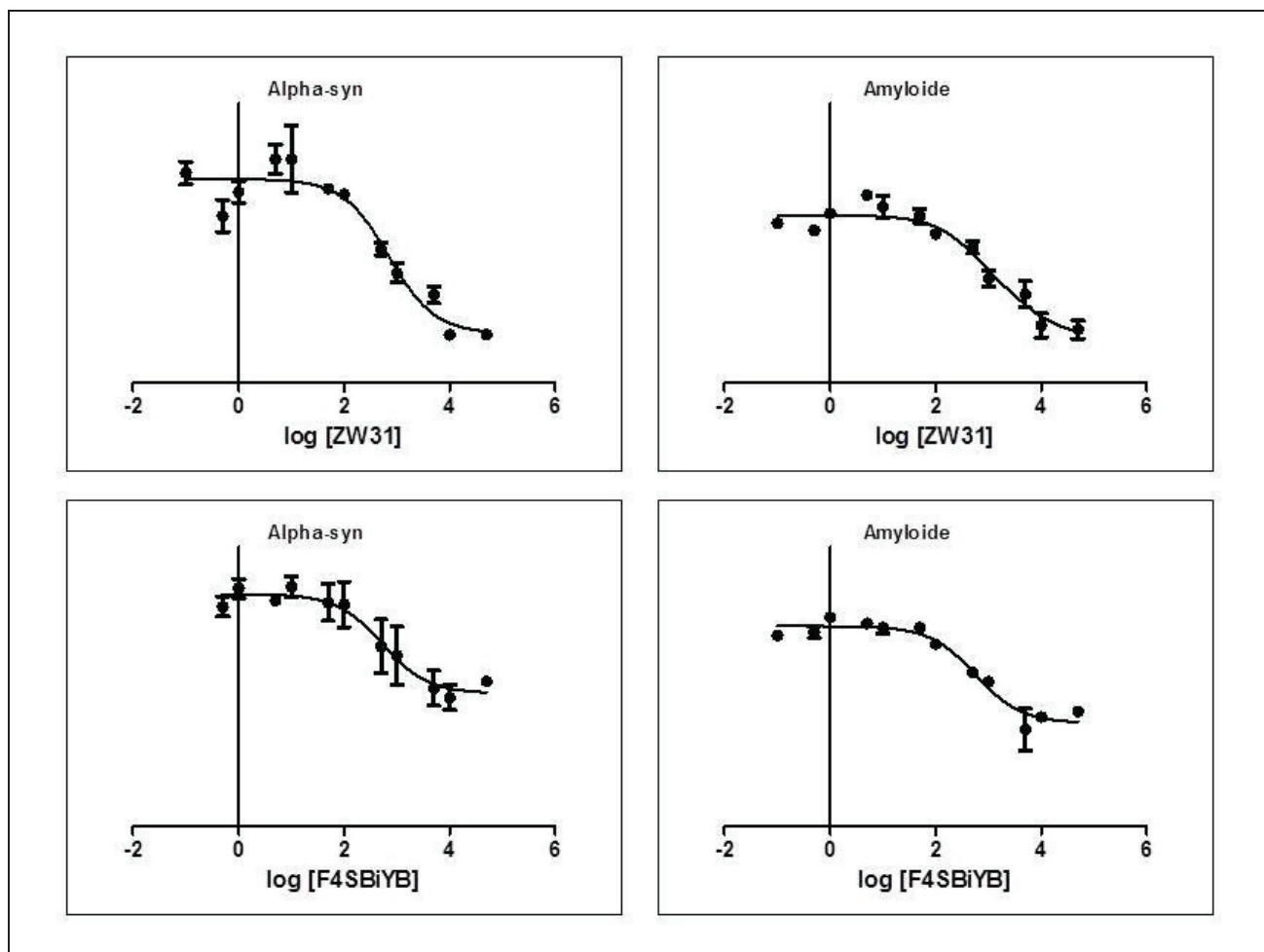


Figure 51 : Représentation des courbes de déplacement de la liaison du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ aux fibrilles d' α -syn et d' A β 1-42 par le ZW31 et le F4SbiYB

Les premiers résultats montrent des molécules intéressantes comme le ZW3 qui semble présenter une forte affinité pour l' α -syn avec un $K_i = 0,0251$ nM mais malheureusement l'affinité pour les fibrilles d'A β 1-42 est également importante ($K_{i1} \sim 0,04401$ nM et $K_{i2} \sim 0,002960$ nM). ZW4 et GG41 présentent ensuite les valeurs de K_i les plus faibles mais bien supérieures à 10 nM ce qui ne semble pas satisfaisant.

4. Discussion et perspectives

Tout d'abord, cette étude a permis de mettre au point un outil nouveau dans notre laboratoire pour évaluer l'affinité de molécules candidates comme radiotraceurs à différentes cibles. Les résultats obtenus avec le [^{18}F]MPPF sont très satisfaisants et parfaitement reproductibles. Cette technique pourra désormais être appliquée à d'autres études.

Les premiers résultats de cette étude de déplacement pour évaluer l'affinité de ces douze molécules ne semblent pas mettre en évidence de composé dont l'affinité pour les fibrilles d' α -syn soit satisfaisante (K_i de l'ordre du nanomolaire) et ne présentant pas d'affinité (ou alors faible) pour les fibrilles A β 1-42. Les résultats obtenus avec le PIB et la thioflavine comme témoins positif et négatif sont satisfaisants car le K_i du PIB est très proche de la valeur décrite dans la littérature [312] et l'affinité de la thioflavine T pour les deux protéines cibles est faible.

En reproduisant nos expériences, nous avons constaté que nous obtenions des résultats très disparates. Par exemple l'étude de déplacement réalisée 4 fois avec le ZW31 a révélé 4 résultats très différents pour les K_i avec les fibrilles d' α -syn ($K_i=0,997$; 109,6 ; 227,1 et 560,4 respectivement). Ce constat est le même pour les fibrilles A β 1-42. De même, si l'on s'intéresse plus particulièrement aux résultats obtenus dans l'étude de la liaison du [^{18}F]BF227 aux fibrilles d' α -syn par compétition, on constate que les bornes de l'IC 95% des K_d sont très étendues. Ceci nous amène à une réflexion sur la validité de notre méthode pour évaluer l'affinité de molécules pour les protéines présentant des structures en feuillets β plissées.

Nous savons qu'il existe un polymorphisme structural d'agrégation bien décrit dans la littérature tout d'abord concernant les fibrilles A β 1-42 [314]. Ce phénomène a ensuite été décrit pour les fibrilles α -syn [42]. Ce phénomène conduit à la formation de plusieurs types de fibrilles qui se distinguent en présentant des structures tridimensionnelles variables (différences de repliements lors de la formation des feuillets β plissés) ainsi que des structures quaternaires variables (lorsque les fibrilles s'imbriquent les unes aux autres). Ces modifications de conformations pourraient donc entraîner l'existence de différents sites de liaisons au niveau de ces fibrilles pour nos radiotraceurs. Nous avons pu constater par nous-même ce polymorphisme d'agrégation en observant des images MET très différentes en fonction du protocole d'agrégation de la protéine monomérique employé. Une modification du pH, une modification du temps d'agrégation a conduit à la formation de fibrilles avec des structures différentes. A l'avenir, nous aimerions explorer ce polymorphisme d'agrégation afin d'obtenir des fibrilles dont la structure se rapprocherait le plus possible de celles retrouvées chez les patients atteints de synucléinopathies. Chaque structure en feuillets β plissés possède des propriétés d'auto-réplication (à la manière des différentes « souches » de protéines prions. Récemment, une équipe a ainsi amplifié des fibrilles à partir d'une petite quantité de tissu de patients Alzheimer (agissant comme un germe) incubé avec une large quantité de peptide amyloïde recombinant non structuré [315]. Si le polymorphisme des fibrilles est très étudié d'un point de vue structural, son influence sur la liaison des radiotraceurs reste totalement inexplorée. Le fait de ne pas contrôler ce polymorphisme au cours de la formation de fibrilles rend ainsi le criblage « classique » peu prédictif de la liaison *in vivo*. Nous proposons donc de développer une méthode de production d'agrégats au polymorphisme contrôlé à partir de tissus humains.

Ce phénomène n'est pas observé lors de l'étude pharmacologique de liaison d'un radiotraceur à son récepteur. Reprenons le cas du [^{18}F]MMPF qui nous a permis de valider notre méthode. Le récepteur 5-HT_{1A} présente une structure constante avec une séquence en acides aminés bien définie (figure). Ainsi le nombre de sites ainsi que la conformation du site de liaison de la molécule reste invariable si l'on utilise toujours le même homogénat cellulaire. Ceci pourrait expliquer que nos résultats étaient beaucoup satisfaisants dans nos études de réceptologie contrairement aux études de binding sur filtres sur fibrilles.

Nous savons également que le [^{18}F]BF227 n'est pas le radiotraceur idéal de l' α -syn. Comme discuté dans la partie précédente, le K_d de ce dernier est de 9,63 nM pour les fibrilles et son affinité est discutable [316]. Le fait de ne pas disposer d'un radiotraceur présentant une affinité satisfaisante pour les fibrilles ne permet pas d'évaluer de façon pertinente l'affinité des molécules candidates.

Le problème du radiomarquage de ces douze molécules doit également être évoqué. En effet, des études préliminaires visant à étudier la séparabilité en HPLC de la molécule fluorée de son précurseur en vue de son radiomarquage au ^{18}F nous ont mis en difficulté. Cependant, très récemment, la molécule ZW27 a pu être séparée de son précurseur avec des temps de rétention satisfaisants. Ainsi, le radiomarquage de cette molécule a pu être réalisé et nous avons pu effectuer une étude de binding *in vitro* par saturation. Les résultats n'ont pas révélé d'affinité satisfaisante pour les fibrilles d' α -syn mais il semblerait que la molécule présente une affinité pour les fibrilles A β 1-42 (K_d = 45,83 nM et B_{max} = 10,57 pmol/nmol de fibrilles). Actuellement, des études supplémentaires sur le composé ZW31

sont en cours et nous pourrions accéder assez rapidement à la molécule radiomarquée pour évaluer son affinité.

Comme évoqué dans la partie précédente, la liaison du [^{18}F]BF227 peut être variable en fonction du modèle de l'étude : *in vivo* et *in vitro* mais également en fonctionnement de la localisation des agrégats [8, 9, 316]. Il nous apparaît alors urgent de mettre au point notre technique d'évaluation de l'affinité des molécules *in vitro* sur des prélèvements de cerveaux de patients atteints de synucléinopathies afin d'estimer au mieux la capacité de liaison des traceurs à leur cible telle qu'elle est présente en clinique.

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre au point une nouvelle technique dans notre laboratoire qui pourra être utilisée dans la recherche et le développement de radiotraceurs avec des cibles différentes de l' α -synucléine. A l'heure actuelle, aucune des molécules candidates ne semble présenter une forte affinité pour les fibrilles d' α -syn mais nous savons que notre méthode n'est pas assez robuste pour pouvoir définitivement exclure ces traceurs. La prochaine étape est d'évaluer ces molécules grâce à des études post-mortem chez des sujets atteints de synucléinopathies.

PARTIE 3
ETUDE D'IMAGERIE FONCTIONNELLE
SUR MODELE ACCELERE DE
SYNUCLEINOPATHIES

1. Objectifs

L'absence de radiotraceur des agrégats d' α -syn nous ont conduit à explorer le système sérotoninergique ainsi que le métabolisme glucidique sur notre modèle animale accéléré et donc à un stage précoce afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques impliqués.

2. Matériels et méthodes

2.1. Etude d'imagerie fonctionnelle

2.1.1. Radiotraceurs

2.1.1.1. [^{18}F]FDG

Le FDG est obtenu par les laboratoires Avanced Accelerator Applications pour le Gluscan® (Saint Genis Pouilly, France) et Cyclopharma pour le Glucotep® (Janneyrias, France).

2.1.1.2. [^{18}F]MPPF

La radiosynthèse du [^{18}F]MPPF a été décrite précédemment dans la partie expérimentale, partie 2, chap 2.1.3. La pureté chimique et radiochimique ont été déterminées par HPLC. Les valeurs étaient supérieures à 98%. L'activité spécifique du traceur radioactif injecté était comprise entre 85.10^3 MBq/ μmole et 326.10^3 MBq/ μmol (soit 2,3 à 8,8 Ci/ μmol).

2.1.1.3. [^{11}C]DASB

Le [^{11}C]CO₂ (dioxyde de carbone 11) gazeux, précurseur primaire produit par réaction nucléaire $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ à l'aide du cyclotron, est piégé sur tamis moléculaire à température

ambiante, permettant une purification du flux entrant. Le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ est ensuite transféré de la cible à l'automate de synthèse Scansys® où il est piégé et réduit en $[^{11}\text{C}]\text{méthane}$. L'iodure de $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$ est ensuite synthétisé à partir du $[^{11}\text{C}]\text{méthane}$. Un piégeage dans un milieu contenant de l'azote liquide et de l'hélium est ensuite réalisé. Le mélange est ensuite distillé. Une réaction de N-méthylation sur le précurseur MASB à l'aide de l'iodure de $[^{11}\text{C}]\text{méthyle}$ est réalisée à 100°C pendant 4 minutes (Figure 52). Une dilution automatique du milieu réactionnel avec 2,5 mL de solvant HPLC est réalisé puis le mélange est transféré dans la boucle d'injection pour être injecté. Une étape de purification sur colonne HPLC Sunfire C18v semi-préparative. La phase mobile est constituée d'un mélange acétonitrile/tampon acétate pH 5,2 et le débit est fixé à 4 mL/min. La détection du composé a lieu à 254 nm. Le $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ est ensuite collecté et purifié (le temps de rétention du composé est compris entre 8 et 12 minutes). Une dilution et une rétention est effectuée sur cartouche SepPak C18. Les solvants HPLC sont éliminés grâce à un rinçage avec de l'eau. Le radiotraceur est élué avec 1 mL d'éthanol puis la cartouche est rincée avec 2 mL d'eau. Le produit est ensuite formulé dans une solution aqueuse d'éthanol à 33% (3 mL). La solution est ensuite diluée avec du NaCl 0,9 % et filtrée sur filtre Millex MP 0,22 μm .

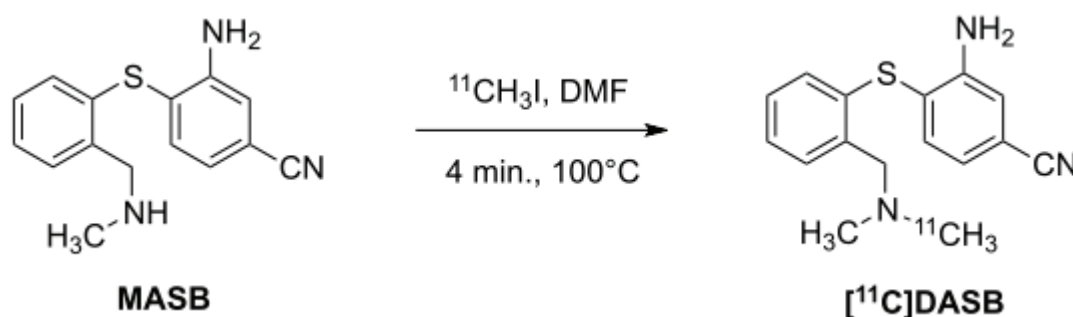


Figure 52 : Schéma de la radiosynthèse du $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$

La pureté chimique et radiochimique ont été déterminées par HPLC (Figure 53). Les valeurs étaient supérieures à 95%. L'activité spécifique du traceur radioactif injecté était comprise entre 23.10^3 MBq/ μ mole et 122.10^3 MBq/ μ mol (soit 0,7 à 3,3 Ci/ μ mol).

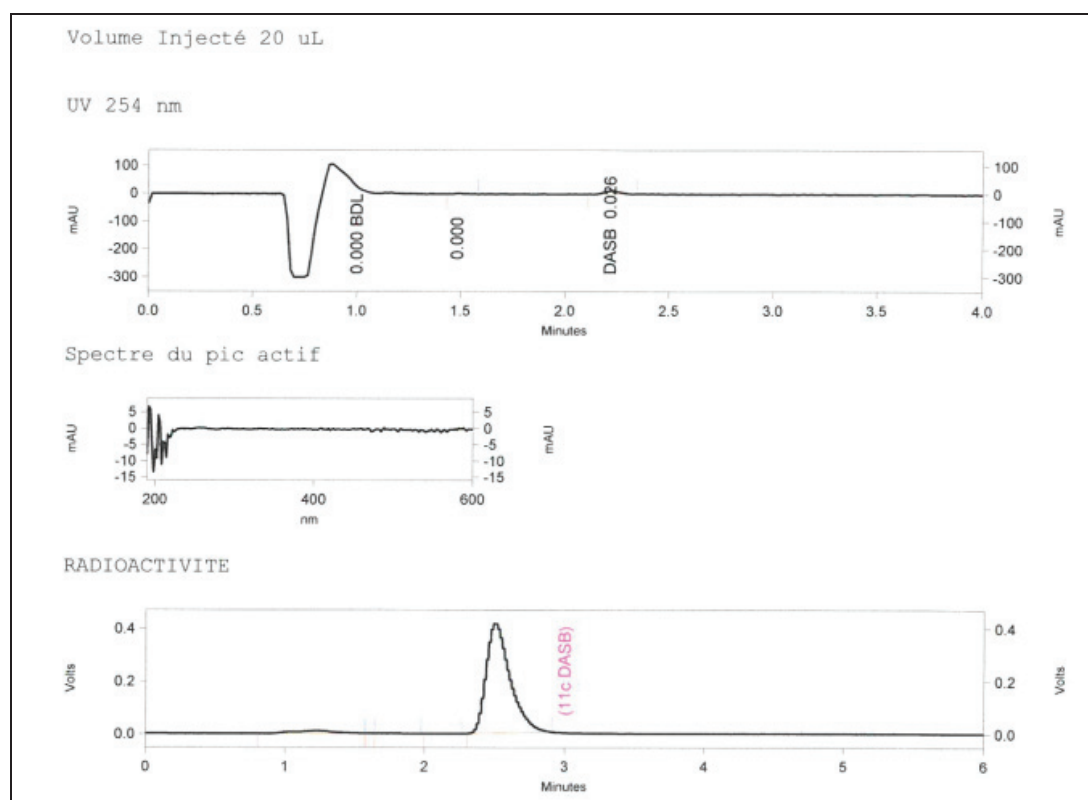


Figure 53 : Contrôle qualité du [^{11}C]DASB

2.1.2. Animaux

L'étude d'imagerie a été réalisée sur le modèle accéléré de synucléinopathies décrit dans l'étude expérimentale, partie 1, chap 2.2. Ces souris étaient âgées d'environ 5 mois. Pour comparer notre modèle animal, nous avons testé de souris de phénotype sauvage C56Bl/6J (WT) Charles River, L'Arbresle, France) et des souris C57BL/6S qui présentent une délétion du locus α -syn (KO α -syn, Harlan, Gannat, France). Tous les animaux utilisés dans

l'expérience ont été appariés pour l'âge. Les conditions d'hébergement des animaux ont été décrites précédemment (l'étude expérimentale, partie 1, chap 2.2)

Une analyse de détection de l' α -synucléine a été réalisée par technique d'immunohistochimie en Western Blot.

Les caractéristiques des animaux étudiés sont résumées dans la figure 54.

Caractéristiques des souris ($[^{18}\text{F}]$ FDG)			
	TgM83	Wild-type	KO alpha-syn
No.	7	7	10
Age (mois)	5,00 \pm 0,00	5,28 \pm 0,49	4,80 \pm 0,42
Poids (g)	23,57 \pm 1,31	23,16 \pm 3,11	22,62 \pm 1,56
Activité injectée (MBq)	7,09 \pm 2,31	6,87 \pm 1,50	7,57 \pm 2,57
Caractéristiques des souris ($[^{18}\text{F}]$ MPPF)			
	TgM83	Wild-type	KO alpha-syn
No.	9	8	6
Age (mois)	5,44 \pm 0,53	5,00 \pm 1,07	5,00 \pm 0,00
Poids (g)	22,87 \pm 2,74	23,00 \pm 3,11	23,63 \pm 6,40
Activité injectée (MBq)	7,49 \pm 1,23	6,62 \pm 2,88	8,16 \pm 4,00
Caractéristiques des souris ($[^{11}\text{C}]$ DASB)			
	TgM83	Wild-type	KO alpha-syn
No.	8	6	7
Age (mois)	5,63 \pm 0,52	5,17 \pm 0,98	5,14 \pm 0,38
Poids (g)	24,16 \pm 1,61	22,38 \pm 2,37	23,99 \pm 2,28
Activité injectée (MBq)	8,62 \pm 1,70	9,52 \pm 3,13	8,88 \pm 3,08

Figure 54 : Caractéristiques des souris étudiées en imagerie fonctionnelle

2.1.3. Etude d'imagerie microTEP

Les images TEP ont été acquises en mode liste, en utilisant un scanner Siemens INVEON PET/CT, avec une résolution nominale dans le plan de $\sim 1,4$ mm pleine largeur-à-mi-hauteur dans le centre de la FOV. Les images ont été reconstruites avec l'atténuation et de correction de dispersion par un algorithme de rétro-projection 3D-filtré (Hamming filtre; la fréquence de coupure était de 0,5 cycles / pixel) et un zoom de 2. Cela a conduit à un volume reconstitué de 159 tranches de 128×128 voxels, dans un cadre de délimitation de $49,7 \times 49,7 \times 126$ mm, avec une taille de voxel $0,388 \times 0,388 \times 0,796$ mm. Les images dynamiques obtenues ont été analysés à l'aide du logiciel INVEON (IRW, Siemens). Les animaux ont été anesthésiés en utilisant de l'isoflurane (4% 2% induction et la maintenance). La fréquence respiratoire a été monitorée pendant toute l'expérience.

Pour l'analyse avec le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, les souris ont été placées à jeun 12 heures avant le début de l'examen. Une injection intra-péritonéale de $7,2 \pm 2,2$ MBq; min 3,5 - max 12,9 MBq est réalisée sur souris vigile et l'acquisition TEP débute une heure après cette injection. La durée de l'examen est de 20 minutes. La tête de souris a été placée dans le champ de vision (FOV) de la caméra. Pour l'analyse avec les deux autres radiotraceurs, une veine caudale a été cathétérisée au préalable et la souris a ensuite été installée sous la caméra microTEP. Une injection directe de $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ et de $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ ($7,9 \pm 2,9$ MBq; min 3,6 - max 15,3 MBq et $9,0 \pm 2,5$ MBq; min 3,9 - max 13,2 MBq respectivement) est réalisée. Une acquisition en mode liste de 60 minutes est lancée immédiatement.

2.1.4. Etude d'imagerie microIRM

Le protocole décrit dans le chapitre Partie 2, 2.4.1. Imagerie microIRM est reproduit à l'identique. Aucune différence anatomique n'est mise en évidence entre les trois groupes de souris.

2.1.5. Analyse des résultats

Pour l'analyse des images obtenues avec le [^{18}F]FDG, les valeurs d'absorption de radioactivité pour chaque ROI ont été exprimées en SUV. Le cortex temporal a été défini comme région de référence car il s'agissait de la région hypofixante pour les trois groupes de souris et les résultats ont ensuite exprimés en SUVR.

Pour le [^{18}F]MPPF et le [^{11}C]DASB, les résultats ont été exprimés en BP (binding potential). Le BP se détermine par la formule suivante décrite la méthode de Logan et al. [317] :

$$\text{BP} = k_3/k_4 = f_2 k_{\text{on}} B_{\text{max}} / k_{\text{off}} = f_2 (B_{\text{max}}/K_d)$$

Le cervelet comme a été défini comme région de référence.

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.0 Software. Les données sont présentées comme la moyenne \pm écart type de la moyenne (SEM). L'analyse de variance (ANOVA), avec le test de Bonferroni pour les analyses intermédiaires, a été réalisée. Les valeurs ont été considérées comme étant significativement différentes pour les valeurs de p inférieures à 0,05 (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,0001$)

2.2. Extraction et dosage de la sérotonine (5HT) et de l'acide 5-hydroxyindoleacetic (HIAA) au niveau cérébral

Afin de mesurer les taux de sérotonine cérébrale ainsi que ceux de son métabolite le HIAA, les souris ont été sacrifiées après les études TEP et les cerveaux ont été traités comme décrit précédemment. Des échantillons de tissus de cerveau (n = 5 pour chacun des trois groupes) ont été pesés et homogénéisés par sonication dans de la glace (2 x 5 sec) dans un tampon de lyse composé de Tris-HCl 50 mM, d'EDTA 1 mM et de Triton x 100%. L'homogénat a été centrifugé à 14 500 rpm pendant 5 min à 4 ° C. Le surnageant, contenant les protéines, est récupéré et recentrifugé à 13000 g pendant 10 minutes. Le jour de l'analyse, une gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de concentration connue de sérotonine et de son métabolite le 5HIAA. Les dialysats ont été injectées dans un système HPLC. Le système de chromatographie liquide pour détection électrochimique « ALEXYS 100 micro » est utilisé pour réaliser des analyses « 2d » en parallèle. L'injection simultanée, réalisée sur 2 systèmes, est effectuée par l'intermédiaire d'une vanne 10 voies. Le détecteur, DECADE II, équipé de 2 cellules de détection, détecte les 2 signaux. Le système ANTEC ALEXYS 100 est utilisé. La température du four est fixée à 35°C pour la détection et la séparation. 10 µL de chaque échantillon est injecté dans le système. L'Intégration des aires sous pics dans les chromatogrammes est effectuée par le logiciel ALEXYS. Pour le dosage de la sérotonine, une cellule de détection VT-03 GC est employée (sensibilité 20 Pa/V) avec une colonne ANTEC de 5 cm de long. La phase mobile se compose d'acide phosphorique 50 mM, de KCl 8 M, de méthanol 10%, d'anhydride octenylsuccinique 500 mg/mL et d'EDTA 0,1 mM. Le pH de ce mélange est fixé à 6. Le débit est de 50 µL/min. Pour le dosage du métabolite de la 5-HT, le 5HIAA, une cellule de détection VT-03 GC est employée (sensibilité

200 Pa/V) avec une colonne ANTEC de 15 cm de long. La phase mobile se compose d'acide phosphorique 50 mM, d'acide citrique 50 nM, de KCl 8 mM, de méthanol 10%, d'anhydride octenylsuccinique 500 mg/mL et d'EDTA 0,1 mM. Le pH de ce mélange est fixé à 3,25. Le débit est de 50 μ L/min.

3. Résultats

3.1. Analyse immunohistochimique de l' α -synucléine

Les résultats des analyses en WB sur homogénats de cerveau révèlent la présence d' α -syn polymérique chez le modèle accéléré de souris TgM83 contrairement aux souris du groupe WT et KO α -syn (Figure 55)

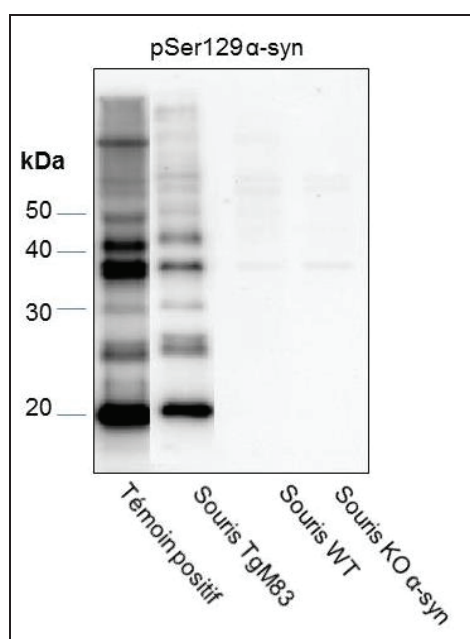


Figure 55: Détection immunohistochimique de l' α -syn sous sa forme pathologique

3.2. Etude d'imagerie microTEP

Les résultats obtenus en imagerie microTEP sont résumés dans les figures 56 à 58. On observe un hypométabolisme du FDG dans l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex cingulaire de notre modèle accéléré de synucléinopathies. Ces différences sont significatives si l'on compare le modèle et les souris KO ainsi que le modèle au phénotype sauvage. On observe visuellement une réduction du métabolisme du FDG des souris WT en comparaison avec les souris KO mais ceci n'est pas significatif.

Ces mêmes régions sont le siège d'une hyper-expression des récepteurs 5-HT_{1A}. Nous observons des différences significatives en comparant souris TgM83 versus souris Ko et TGM83 versus souris WT. De la même façon qu'avec le FDG, le niveau d'expression du récepteur 5-HT_{1A} du groupe WT semble intermédiaire entre le modèle transgénique et les souris KO mais cette différence n'est pas significative. Aucune différence d'expression du SERT n'a été mise en évidence entre les trois groupes de souris.

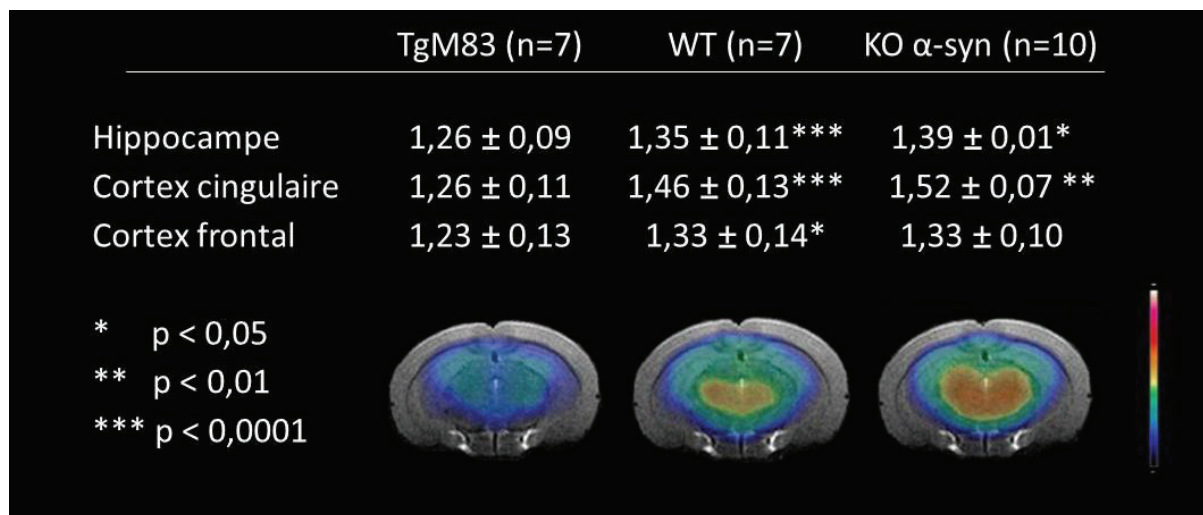


Figure 56 : Imagerie TEP au [^{18}F]FDG

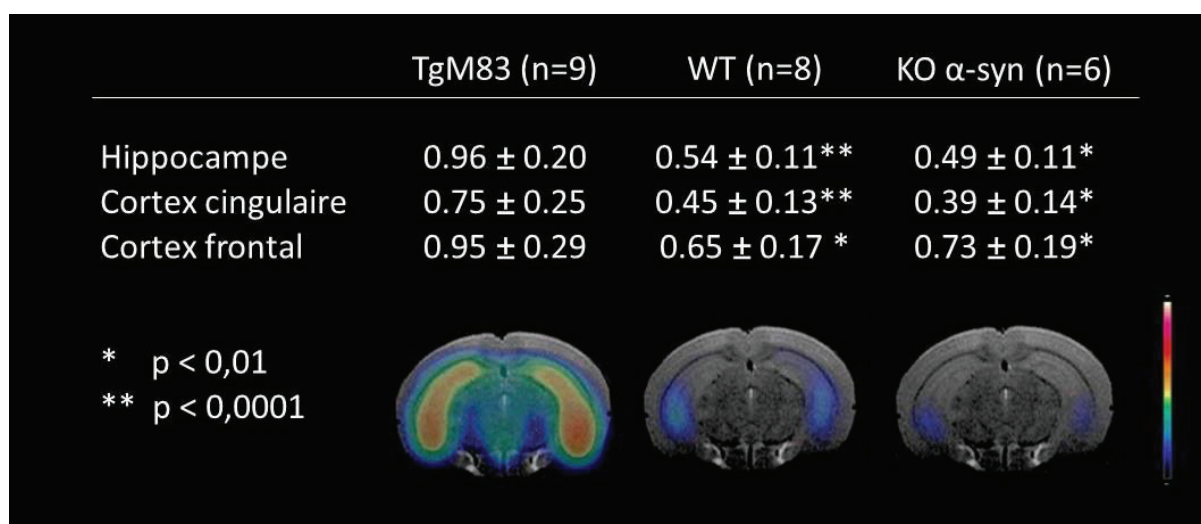


Figure 57 : Imagerie TEP au [^{18}F]MPPF

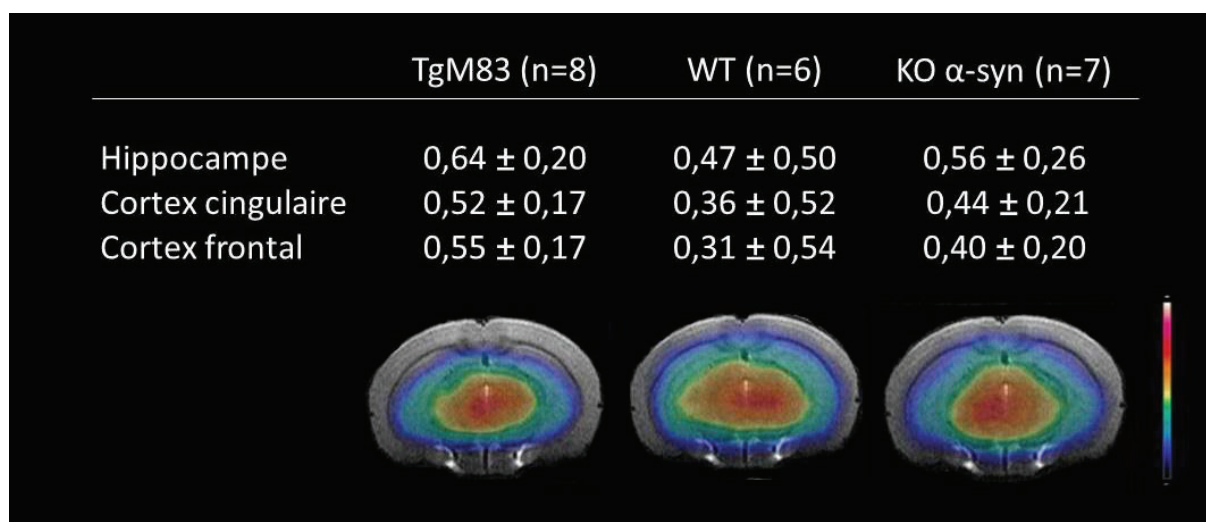


Figure 58: Imagerie TEP au [^{11}C]DASB

3.3. Dosage de la 5-HT et du 5HIAA cérébraux

Une augmentation de la concentration de sérotonines cérébrale est retrouvée dans notre modèle animal en comparaison aux souris WT et KO α -syn. Les valeurs respectives étaient de $36,1 \pm 13,03$ nM.L-1 versus $13,62 \pm 5,64$ nM.L-1 chez des souris alpha-syn KO (* $p < 0,05$,) et de $15,7 \pm 6,5$ nM.L-1 chez les souris WT. Aucune différence n'est observée en comparant les souris KO α -syn et WT. Les concentrations cérébrales de HIAA mesurées présentaient des valeurs de $358,5 \pm 55,5$ nM.L-1 pour les souris transgéniques; $330,9 \pm 50,2$ nM.L-1 pour les souris WT et $336,0 \pm 52,6$ nM.L-1 pour les souris KO α -syn. Aucune différence significative n'a été observée entre les trois groupes.

Une tendance à la diminution du ratio HIAA / 5HT a été observée chez les souris TgM83 en comparaison aux deux autres groupes (α -syn et souris WT avec des valeurs respectives de $11,2 \pm 2,3$ contre $34,4 \pm 19,9$ et $42,4 \pm 25,2$. Ces données sont résumées sur la figure 59.

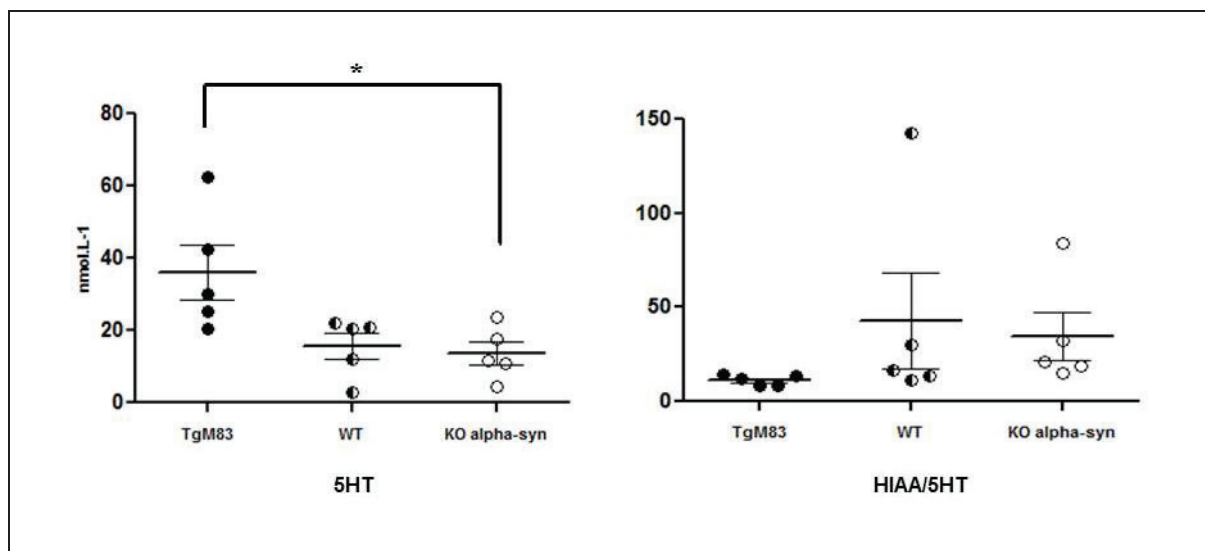


Figure 59 : Dosage de la 5HT cérébrale et de son métabolite HIAA

4. Discussion et perspectives

À notre connaissance, cette étude constitue la première exploration de la neurotransmission sérotoninergique et du métabolisme du glucose d'un modèle animal de synucléinopathie. Rappelons que la TEP est une technique d'intérêt majeur permettant d'évaluer *in vivo* des processus physiologiques, biochimiques et d'explorer les systèmes de neurotransmission. L'un des principaux bénéfices de la microTEP est qu'il permet les mêmes expériences sur des rongeurs, des primates non humains, et les humains, permettant des études longitudinales et en facilitant les traductions entre la recherche fondamentale et clinique. Par exemple, la consommation cérébrale de glucose, mesurée par imagerie TEP au [^{18}F]FDG, est actuellement utilisée pour l'évaluation de patients souffrant de maladies neurodégénératives comme évoqué précédemment dans l'étude bibliographique, partie 3, chap 1.1. D'une manière translationnelle, l'application de cette technologie à un modèle de souris transgénique Alzheimer a révélé un hypométabolisme similaire à celui mis en évidence chez l'Homme ce qui contribue à une meilleure compréhension des processus neurodégénératifs [318, 319].

Dans notre étude, les données microTEP obtenues avec le [^{18}F]FDG ont révélé un hypométabolisme précoce dans de nombreuses régions du cerveau comme l'hippocampe, le cortex cingulaire, le cortex frontal et le cortex occipital du modèle animal de synucléinopathies. Cette réduction du métabolisme du glucose pourrait expliquer une déficience du comportement mais ce traceur métabolique ne permet pas l'identification des événements moléculaires. Pour cette raison, nous avons choisi d'explorer la neurotransmission sérotoninergique afin de mettre en évidence une relation plus étroite avec l'expression prodromique de la neurodégénérescence comme par exemple, l'anxiété et

les perturbations cognitives qui sont décrites sur le modèle non accéléré [320]. L'étude des récepteurs 5-HT_{1A} est particulièrement intéressante pour l'exploration des mécanismes physiopathologiques des maladies neurodégénératives car ils sont fortement exprimés dans les régions cérébrales connues pour jouer un rôle dans la régulation des processus cognitifs [134]. Plusieurs études de TEP ont décrit une réduction de l'expression des récepteurs 5-HT_{1A} dans le mésencéphale chez les patients parkinsoniens [258, 259]. Une autre étude a révélé une densité des récepteurs 5-HT_{1A} plus élevée dans le cortex temporal de patients atteints de DCL et de MP présentant un comportement dépressif [261]. Dans notre modèle animal, nous avons observé une forte augmentation de la densité des récepteurs 5-HT_{1A}. L'augmentation de la densité de ces récepteurs a déjà été rapportée dans des études TEP précliniques et cliniques antérieures explorant les processus neurodégénératifs à un stade précoce. Par exemple, une surexpression des récepteurs 5-HT_{1A} évaluée avec le [¹⁸F]MPPF a été décrite dans notre laboratoire sur un modèle de rat injecté avec des peptides bêta-amyloïdes [321]. De la même façon, une augmentation de la densité de ces récepteurs est observée dans la phase prodromique de patients atteints de MA avec le même produit radiopharmaceutique [322]. L'augmentation de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} peut être interprétée comme un éventuel mécanisme compensatoire survenant dès les premiers stades de la neurotoxicité provoquée par la surexpression des protéines agrégées notamment l' α -syn. Cette surexpression de 5-HT_{1A} doit être mise en regard avec l'augmentation significative de la 5-HT mesurée dans l'ensemble du cerveau de souris TgM83. Une étude récente a montré une réduction des niveaux de sérotonine dans le tronc cérébral de souris TgM83 non inoculées âgées de 12 mois. La densité des fibres sérotoninergiques dans le gyrus denté dorsal était significativement moins importante chez les souris transgéniques en comparaison au groupe témoin [323]. Ces résultats sont

contradictoires avec ceux de notre étude. Néanmoins, il est important de souligner que ces observations ont été faites sur un modèle de synucléinopathies à un stade avancé de la maladie, contrairement à notre modèle animal observé au stade précoce. Par conséquent, nous pouvons proposer un mécanisme distinct impliquant différemment la neurotransmission de la sérotonine en fonction du stade de la maladie. Au début de la maladie, au stade où se développe la surexpression de l' α -syn, il existe une hypersécrétion de la sérotonine qui précède un processus neurodégénératif avec une diminution secondaire de la concentration de 5-HT et une possible diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{1A}.

La mesure de la densité du transporteur SERT est en accord avec cette hypothèse. Nous n'avons observé aucune différence de fixation du [¹¹C]DASB dans notre modèle accéléré de synucléinopathie en comparaison aux groupes WT et KO α -syn. La densité de SERT peut être considérée comme un marqueur de la distribution de la sérotonine neuronale [ref], nous pouvons donc supposer qu'à ce stage précoce de synucléinopathie, il n'existe pas de véritable phénomène de neurodégénérescence. Ce phénomène débute avec la destruction des neurones du système sérotoninergique. Les résultats *in vitro* publiés par d'autres équipes étaient similaires : deux études rapportent une densité inchangée du SERT chez les souris A53T [323, 324]

L'exploration de la neurogenèse dans notre modèle accéléré de synucléinopathie serait très intéressante. La neurogenèse a été évaluée chez des souris TgM83 non inoculées âgées de 4-5 mois (âge correspondant à un stade précoce de la maladie). Une réduction de neurogenèse a été observée principalement dans l'hippocampe [325]. De façon intéressante, il a été montré qu'un traitement par fluoxétine avait rétabli le déficit prolifératif des cellules de l'hippocampe [256], mettant en évidence le lien entre la neurotransmission de la

sérotonine surexprimée et la neurogenèse durant les premiers stades du processus neurodégénératif. La figure évoque les hypothèses d'explication des désordres du métabolisme sérotoninergique et du métabolisme glucidique dans les synucléinopathies.

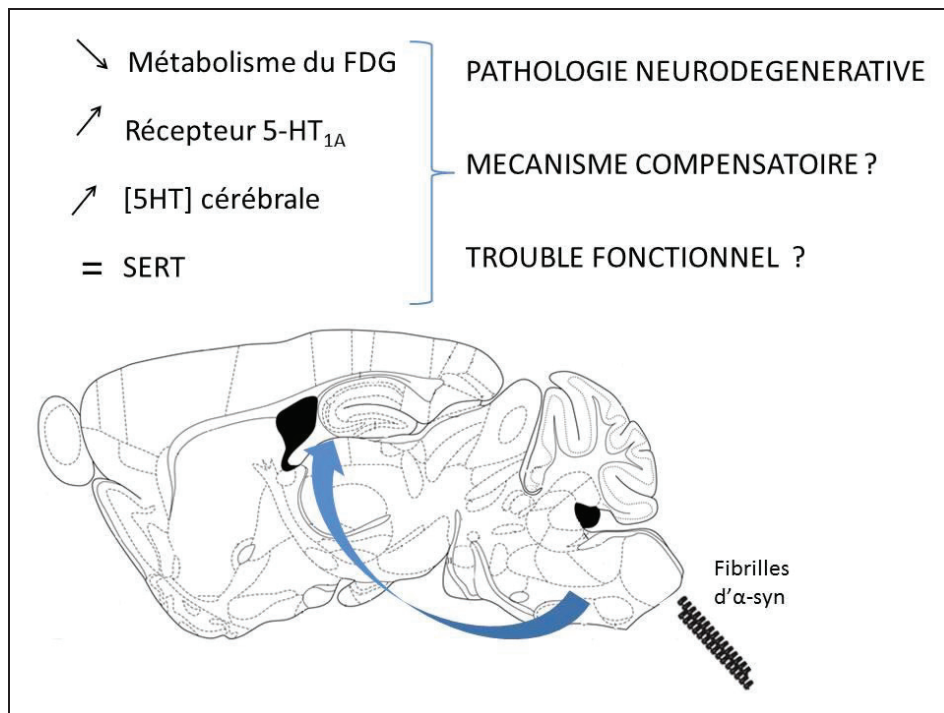


Figure 60 : Hypothèses de projection

En conclusion, cette étude fournit des preuves de l'implication de système sérotoninergique dans la physiopathologie de synucléinopathies, en particulier au cours de ses premiers stades avant l'expression clinique de la maladie. La réactivité du système sérotoninergique pourrait être proposée comme une fenêtre thérapeutique pour le traitement spécifique des troubles cliniques précoces. De façon complémentaire, nos résultats soulignent l'intérêt de la TEP dans la neuro-imagerie *in vivo* pour l'exploration des systèmes de neurotransmission.

Cette étude ouvre également de nouvelles pistes de recherche comme l'exploration de la neurotransmission dopaminergique à un stage précoce de la pathologie. En effet, nous savons que le système dopaminergique est profondément altéré chez les sujets atteints de synucléinopathies. L'exploration des phénomènes de neurogenèse à un stade précoce constitue également une piste d'exploration intéressante. Il ne faut cependant pas oublier que ces études réalisées chez l'animal devront être mise en regard des données observées en clinique car aucun modèle animal n'est capable à l'heure actuelle de reproduire tous les phénomènes physiopathologiques présents chez l'Homme.

CONCLUSION GENERALE

Les maladies neurodégénératives sont de nos jours un sujet de santé publique majeur ayant un impact économique et humain destiné à croître avec le vieillissement de la population. La maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée font partie d'une famille de maladies neurodégénératives liées à l'accumulation pathologique d'une protéine : l' α -synucléine (α -syn), appelées les synucléinopathies. Actuellement, il n'existe aucune méthode de diagnostic formel du vivant du patient. À ce jour, le diagnostic de certitude n'est établi que sur des études post-mortem histopathologiques. Le chevauchement clinique considérable des synucléinopathies nécessite de développer des biomarqueurs qui permettraient de réaliser un diagnostic précoce des patients afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les synucléinopathies et qui constitueraient une aide indispensable au développement de nouvelles thérapies.

Les travaux effectués au cours de cette thèse se sont articulés en trois axes distincts partageant un objectif commun, le développement de nouveaux radiotraceurs TEP appliqués au diagnostic et à l'exploration des mécanismes physiopathologiques des synucléinopathies.

Dans une première partie, nous avons caractérisé et validé un modèle murin de synucléinopathies pour l'imagerie TEP. Nous avons également conclu que le [^{18}F]BF227 ne pouvait être employé comme radiotraceur des agrégats d' α -syn exprimés au niveau du tronc cérébral et de l'hippocampe de ces souris.

La seconde partie a permis la mise au point d'une nouvelle technique d'évaluation de l'affinité de molécules (radiomarquées ou non) pour une cible donnée. Ainsi, douze ligands froids ont pu être testés sur fibrilles d' α -syn et A β 1-42. Actuellement, aucun composé ne semble présenter les critères pour être un radiotraceur idéal des synucléinopathies mais nous avons identifié les limites de notre méthodologie de notre étude sur protéines agrégées *in vitro*.

Enfin, la troisième et dernière partie de ce travail a mis en évidence un hypométabolisme glucidique ainsi qu'une surexpression des récepteurs 5-HT_{1A} grâce à une étude d'imagerie microTEP sur le modèle murin de synucléinopathies évalué à un stade précoce de la pathologie. Ces résultats nous ont amenés à une réflexion sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les synucléinopathies. On observe une hyperactivation des voies sérotoninergiques à un stade précoce de la maladie alors que des études réalisées chez l'homme à un stade avancé avaient montrés des résultats inverses.

Au final, cette étude a montré l'intérêt et les limites de l'utilisation l'imagerie TEP et des modèles animaux pour le développement d'un nouveau radiotraceur des synucléinopathies ainsi que pour l'exploration des mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces pathologies. Les travaux seront poursuivis dans notre laboratoire pour continuer à explorer le modèle animal notamment sur le plan de la neurogenèse et de l'étude de la neurotransmission dopaminergique. Les molécules candidates synthétisées seront explorées grâce à des études post-mortem sur patients atteints de synucléinopathies. De nouvelles études en chimie seront réalisées afin de permettre un radiomarquage des

ligands ayant présenté des résultats intéressants *in vitro*. Ces molécules pourront ensuite être évaluées *in vivo* grâce à la réalisation d'études microTEP sur le modèle murin. Si les résultats sont satisfaisants, une étude clinique *first-in-man* pourrait être réalisée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wittchen HU, Jacobi F, et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(9): 655-79.
2. Kovacs G and Budka H. Protein-based neuropathology and molecular classification of human neurodegenerative diseases. *Protein Folding and Misfolding : Neurodegenerative Diseases.* B. H. Springer-Verlag.2009
3. Lippa CF, Duda JE, et al. DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers. *Neurology.* 2007; 68(11): 812-9.
4. Zimmer L and Luxen A. PET radiotracers for molecular imaging in the brain: past, present and future. *Neuroimage.* 2012; 61(2): 363-70.
5. Gelosa G and Brooks DJ. The prognostic value of amyloid imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012; 39(7): 1207-19.
6. Landau SM, Thomas BA, et al. Amyloid PET imaging in Alzheimer's disease: a comparison of three radiotracers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014; 41(7): 1398-407.
7. Vernon AC, Ballard C and Modo M. Neuroimaging for Lewy body disease: is the in vivo molecular imaging of alpha-synuclein neuropathology required and feasible? *Brain Res Rev.* 2010; 65(1): 28-55.
8. Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, et al. In vitro characterisation of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies. *Eur J Pharmacol.* 2009; 617(1-3): 54-8.
9. Kikuchi A, Takeda A, et al. In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain.* 2010; 133(Pt 6): 1772-8.
10. Duty S and Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(4): 1357-91.
11. Jakes R, Spillantini MG and Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 1994; 345(1): 27-32.
12. Beyer K. Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol.* 2006; 112(3): 237-51.
13. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem.* 2007; 103(1): 17-37.
14. Yoshimoto M, Iwai A, et al. NACP, the precursor protein of the non-amyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer disease amyloid, binds A beta and stimulates A beta aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(20): 9141-5.

15. Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ and Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* 2001; 276(4): 2380-6.
16. Hoyer W, Cherny D, Subramaniam V and Jovin TM. Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry.* 2004; 43(51): 16233-42.
17. Lavedan C. The synuclein family. *Genome Res.* 1998; 8(9): 871-80.
18. Beyer K, Humbert J, et al. A variable poly-T sequence modulates alpha-synuclein isoform expression and is associated with aging. *J Neurosci Res.* 2007; 85(7): 1538-46.
19. Surguchov A. Molecular and cellular biology of synucleins. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008; 270: 225-317.
20. Polymeropoulos MH, Lavedan C, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997; 276(5321): 2045-7.
21. Kruger R, Kuhn W, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998; 18(2): 106-8.
22. Zarranz JJ, Alegre J, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004; 55(2): 164-73.
23. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013; 28(6): 811-3.
24. Lesage S, Anheim M, et al. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol.* 2013.
25. Proukakis C, Dudzik CG, et al. A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology.* 2013; 80(11): 1062-4.
26. George JM, Jin H, Woods WS and Clayton DF. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron.* 1995; 15(2): 361-72.
27. Maroteaux L, Campanelli JT and Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 1988; 8(8): 2804-15.
28. Galvin JE, Schuck TM, Lee VM and Trojanowski JQ. Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra. *Exp Neurol.* 2001; 168(2): 347-55.
29. Schneider BL, Seehus CR, et al. Over-expression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation. *Hum Mol Genet.* 2007; 16(6): 651-66.
30. Yu S, Li X, et al. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience.* 2007; 145(2): 539-55.

31. Surgucheva I, McMahon B and Surguchov A. gamma-synuclein has a dynamic intracellular localization. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2006; 63(8): 447-58.
32. Li WW, Yang R, et al. Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*. 2007; 18(15): 1543-6.
33. Borghi R, Marchese R, et al. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett*. 2000; 287(1): 65-7.
34. El-Agnaf OM, Salem SA, et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J*. 2006; 20(3): 419-25.
35. Hashimoto M, Yoshimoto M, et al. NACP, a synaptic protein involved in Alzheimer's disease, is differentially regulated during megakaryocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 237(3): 611-6.
36. Kim TD, Choi E, Rhim H, Paik SR and Yang CH. Alpha-synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324(4): 1352-9.
37. Surguchov A, McMahan B, Masliah E and Surgucheva I. Synucleins in ocular tissues. *J Neurosci Res*. 2001; 65(1): 68-77.
38. Wang W, Perovic I, et al. A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(43): 17797-802.
39. Bartels T, Choi JG and Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011; 477(7362): 107-10.
40. Wood SJ, Wypych J, et al. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 1999; 274(28): 19509-12.
41. Kumar S and Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*. 2011; 3(8): 803-12.
42. Bousset L, Pieri L, et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun*. 2013; 4: 2575.
43. Ghosh D, Mondal M, et al. The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates alpha-Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry*. 2013; 52(40): 6925-7.
44. Fujiwara H, Hasegawa M, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(2): 160-4.
45. Clayton DF and George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*. 1998; 21(6): 249-54.
46. Cooper AA, Gitler AD, et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*. 2006; 313(5785): 324-8.

47. Burre J, Sharma M, et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*. 2010; 329(5999): 1663-7.
48. Ostrerova N, Petrucelli L, et al. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*. 1999; 19(14): 5782-91.
49. Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM and Sudhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*. 2005; 123(3): 383-96.
50. Clayton DF and George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*. 1999; 58(1): 120-9.
51. Zhu M, Qin ZJ, Hu D, Munishkina LA and Fink AL. Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry*. 2006; 45(26): 8135-42.
52. Alves Da Costa C, Paitel E, Vincent B and Checler F. Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 2002; 277(52): 50980-4.
53. Gorbatyuk OS, Li S, et al. alpha-Synuclein expression in rat substantia nigra suppresses phospholipase D2 toxicity and nigral neurodegeneration. *Mol Ther*. 2010; 18(10): 1758-68.
54. Perez RG, Waymire JC, et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*. 2002; 22(8): 3090-9.
55. Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T and Lansbury PT, Jr. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*. 2002; 418(6895): 291.
56. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ and Stefanis L. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011; 10(11): 1015-25.
57. Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY and Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol*. 2010; 9(11): 1128-38.
58. Narkiewicz J, Giachin G and Legname G. In vitro aggregation assays for the characterization of alpha-synuclein prion-like properties. *Prion*. 2014; 8(1).
59. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, et al. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain*. 2013; 136(Pt 4): 1128-38.
60. Foulds P, Mann DM and Allsop D. Phosphorylated alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease and related disorders. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012; 12(2): 115-7.
61. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(7): 492-501.
62. HAS. Guide parcours de soins - Maladie de Parkinson Juin 2014.

63. Mollenhauer B, Forstl H, et al. Lewy body and parkinsonian dementia: common, but often misdiagnosed conditions. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107(39): 684-91.
64. McKeith IG, Dickson DW, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology.* 2005; 65(12): 1863-72.
65. Van Everbroeck B, Dobbeleir I, et al. Differential diagnosis of 201 possible Creutzfeldt-Jakob disease patients. *J Neurol.* 2004; 251(3): 298-304.
66. Minett TS, Thomas A, et al. What happens when donepezil is suddenly withdrawn? An open label trial in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2003; 18(11): 988-93.
67. Grace J, Daniel S, et al. Long-Term use of rivastigmine in patients with dementia with Lewy bodies: an open-label trial. *Int Psychogeriatr.* 2001; 13(2): 199-205.
68. Samuel W, Caligiuri M, et al. Better cognitive and psychopathologic response to donepezil in patients prospectively diagnosed as dementia with Lewy bodies: a preliminary study. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2000; 15(9): 794-802.
69. Edwards KR, Hershey L, et al. Efficacy and safety of galantamine in patients with dementia with Lewy bodies: a 12-week interim analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004; 17 Suppl 1: 40-8.
70. McKeith I, Del Ser T, et al. Efficacy of rivastigmine in dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled international study. *Lancet.* 2000; 356(9247): 2031-6.
71. Boeve BF, Silber MH and Ferman TJ. Melatonin for treatment of REM sleep behavior disorder in neurologic disorders: results in 14 patients. *Sleep Med.* 2003; 4(4): 281-4.
72. Poewe W. Treatment of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Mov Disord.* 2005; 20 Suppl 12: S77-82.
73. Papp MI, Kahn JE and Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci.* 1989; 94(1-3): 79-100.
74. Ahmed Z, Asi YT, et al. The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012; 38(1): 4-24.
75. Kollensperger M, Geser F, et al. Presentation, diagnosis, and management of multiple system atrophy in Europe: final analysis of the European multiple system atrophy registry. *Mov Disord.* 2010; 25(15): 2604-12.
76. Peeraully T. Multiple system atrophy. *Semin Neurol.* 2014; 34(2): 174-81.
77. de Dreuille O, Maszelin P, Foehrenbach H, Bonardel G and Gaillard D. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *EMC-Radiologie.* 2004; 1(1): 2-35.

78. Foulds PG, Yokota O, et al. Post mortem cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other alpha-synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis.* 2012; 45(1): 188-95.
79. Walker Z, Costa DC, et al. Differentiation of dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease using a dopaminergic presynaptic ligand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002; 73(2): 134-40.
80. Walker Z and Cummings JL. [123I]N-omega-fluoropropyl-2beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)nortropane single-photon emission computed tomography brain imaging in the diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Alzheimers Dement.* 2012; 8(1): 74-83.
81. Defebvre LJ, Leduc V, et al. Technetium HMPAO SPECT study in dementia with Lewy bodies, Alzheimer's disease and idiopathic Parkinson's disease. *J Nucl Med.* 1999; 40(6): 956-62.
82. Treglia G, Stefanelli A, et al. Diagnostic performance of iodine-123-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in differential diagnosis between Parkinson's disease and multiple-system atrophy: a systematic review and a meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2011; 113(10): 823-9.
83. Kashihara K, Ohno M, Kawada S and Okumura Y. Reduced cardiac uptake and enhanced washout of 123I-MIBG in pure autonomic failure occurs conjointly with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *J Nucl Med.* 2006; 47(7): 1099-101.
84. Nurmi E, Ruottinen HM, et al. Rate of progression in Parkinson's disease: a 6-[18F]fluoro-L-dopa PET study. *Mov Disord.* 2001; 16(4): 608-15.
85. Redgrave P, Rodriguez M, et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11(11): 760-72.
86. Kantarci K, Lowe VJ, et al. Multimodality imaging characteristics of dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Aging.* 2012; 33(9): 2091-105.
87. Mach RH. New Targets for the Development of PET Tracers for Imaging Neurodegeneration in Alzheimer Disease. *J Nucl Med.* 2014; 55(8): 1221-4.
88. Eller M and Williams DR. alpha-Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(3): 403-8.
89. Unterberger U, Lachmann I, et al. Detection of disease-associated alpha-synuclein in the cerebrospinal fluid: a feasibility study. *Clin Neuropathol.* 2014; 33(5): 329-34.
90. Mackin RS, Insel P, et al. Cerebrospinal Fluid alpha-Synuclein and Lewy Body-Like Symptoms in Normal Controls, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2014.
91. Shah M, Seibyl J, Cartier A, Bhatt R and Catafau AM. Molecular Imaging Insights into Neurodegeneration: Focus on alpha-Synuclein Radiotracers. *J Nucl Med.* 2014.
92. Levine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease-βα αμυλοιδ πεπτιδес : Δετεχτιον οφ αμυλοιδ αγγρεγατιον ιν σολυτιον. *Protein Sci.* 1993; 2: 404-10.

93. Maetzler W, Reimold M, et al. [11C]PIB binding in Parkinson's disease dementia. *Neuroimage*. 2008; 39(3): 1027-33.
94. Fodero-Tavoletti MT, Smith DP, et al. In vitro characterization of Pittsburgh compound-B binding to Lewy bodies. *J Neurosci*. 2007; 27(39): 10365-71.
95. Kudo Y, Okamura N, et al. 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6- (2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med*. 2007; 48(4): 553-61.
96. Bagchi DP, Yu L, et al. Binding of the Radioligand SIL23 to alpha-Synuclein Fibrils in Parkinson Disease Brain Tissue Establishes Feasibility and Screening Approaches for Developing a Parkinson Disease Imaging Agent. *PLoS One*. 2013; 8(2): e55031.
97. Erspamer V. Historical introduction: the Italian contribution to the discovery of 5-hydroxytryptamine (enteramine, serotonin). *J Hypertens Suppl*. 1986; 4(1): S3-5.
98. Dalgliesh CE, Toh CC and Work TS. Fractionation of the smooth muscle stimulants present in extracts of gastro-intestinal tract. Identification of 5-hydroxytryptamine and its distinction from substance P. *J Physiol*. 1953; 120(3): 298-310.
99. Ishihara A, Hashimoto Y, et al. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J*. 2008; 54(3): 481-95.
100. Allain P (2008). *Les médicaments*, 3ème édition.
101. Dahlstrom A and Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 1964; 20(7): 398-9.
102. Charnay Y and Leger L. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010; 12(4): 471-87.
103. Baker KG, Halliday GM and Tork I. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*. 1990; 301(2): 147-61.
104. Andrade R and Haj-Dahmane S. Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. *ACS Chem Neurosci*. 2013; 4(1): 22-5.
105. Deneris ES and Wyler SC. Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat Neurosci*. 2012; 15(4): 519-27.
106. Hornung JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat*. 2003; 26(4): 331-43.
107. Pineyro G and Blier P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*. 1999; 51(3): 533-91.
108. Hensler JG. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006; 30(2): 203-14.

109. Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED and Andrews AM. Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chem Neurosci*. 2013; 4(1): 72-83.
110. Gaddum JH and Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother*. 1957; 12(3): 323-8.
111. Peroutka SJ and Snyder SH. Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid diethylamide and [³H]spiroperidol. *Mol Pharmacol*. 1979; 16(3): 687-99.
112. Bradley PB, Engel G, et al. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*. 1986; 25(6): 563-76.
113. Hoyer D, Clarke DE, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994; 46(2): 157-203.
114. Hoyer D, Hannon JP and Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 71(4): 533-54.
115. Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M and Lanfumey L. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol*. 2006; 70(3): 1013-21.
116. Hamon M and Gozlan H. Les récepteurs centraux de la sérotonine *Med Sci (Paris)*. 1993; 9(1).
117. Pedigo NW, Yamamura HI and Nelson DL. Discrimination of multiple [³H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem*. 1981; 36(1): 220-6.
118. Arvidsson LE, Hacksell U, et al. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J Med Chem*. 1981; 24(8): 921-3.
119. Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J and Hamon M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature*. 1983; 305(5930): 140-2.
120. Hamon M, Gozlan H, et al. The central 5-HT_{1A} receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 600: 114-29; discussion 29-31.
121. el Mestikawy S, Riad M, et al. Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett*. 1990; 118(2): 189-92.
122. Kia HK, Miquel MC, et al. Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1996; 365(2): 289-305.
123. Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR and Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J Biol Chem*. 1990; 265(10): 5825-32.

124. Fargin A, Raymond JR, et al. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature*. 1988; 335(6188): 358-60.
125. Kobilka BK, Frielle T, et al. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*. 1987; 329(6134): 75-9.
126. Lanfumey L and Hamon M. 5-HT₁ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004; 3(1): 1-10.
127. Hoyer D, Pazos A, Probst A and Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. *Brain Res*. 1986; 376(1): 85-96.
128. Hoyer D, Pazos A, Probst A and Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ recognition sites. *Brain Res*. 1986; 376(1): 97-107.
129. Verge D, Daval G, et al. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci*. 1986; 6(12): 3474-82.
130. Pazos A and Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res*. 1985; 346(2): 205-30.
131. Kung MP, Frederick D, Mu M, Zhuang ZP and Kung HF. 4-(2'-Methoxy-phenyl)-1-[2'-(n-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl- piperazine ([¹²⁵I]p-MPPI) as a new selective radioligand of serotonin-1A sites in rat brain: in vitro binding and autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995; 272(1): 429-37.
132. Dompert WU, Glaser T and Traber J. 3H-TVX Q 7821: identification of 5-HT₁ binding sites as target for a novel putative anxiolytic. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1985; 328(4): 467-70.
133. Khawaja X, Evans N, Reilly Y, Ennis C and Minchin MC. Characterisation of the binding of [3H]WAY-100635, a novel 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor antagonist, to rat brain. *J Neurochem*. 1995; 64(6): 2716-26.
134. Lanfumey L and Hamon M. Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol*. 2000; 27(5): 429-35.
135. Pompeiano M, Palacios JM and Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci*. 1992; 12(2): 440-53.
136. Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H and Hamon M. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci*. 1990; 2(12): 1144-54.

137. Riad M, Garcia S, et al. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol.* 2000; 417(2): 181-94.
138. Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M and Descarries L. Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci.* 2001; 21(21): 8378-86.
139. Lacivita E, Di Pilato P, et al. The therapeutic potential of 5-HT_{1A} receptors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22(8): 887-902.
140. Pytka K, Walczak M, et al. The antidepressant-like activity of 6-methoxy-2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-9H-xanthen-9-one involves serotonergic 5-HT and 5-HT receptors activation. *Eur J Pharmacol.* 2015; 764: 537-46.
141. Kim MH and Leem YH. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT_{1A} receptor and cAMP signaling in hippocampus. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2014; 18(1): 97-104.
142. Iderberg H, Francardo V and Pioli EY. Animal models of L-DOPA-induced dyskinesia: an update on the current options. *Neuroscience.* 2012; 211: 13-27.
143. Cliffe IA. A retrospect on the discovery of WAY-100635 and the prospect for improved 5-HT(1A) receptor PET radioligands. *Nucl Med Biol.* 2000; 27(5): 441-7.
144. Passchier J and van Waarde A. Visualisation of serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptors in the central nervous system. *Eur J Nucl Med.* 2001; 28(1): 113-29.
145. Pike VW, Halldin C and Wikstrom HV. Radioligands for the study of brain 5-HT_{1A} receptors in vivo. *Prog Med Chem.* 2001; 38: 189-247.
146. Kumar JS and Mann JJ. PET tracers for 5-HT(1A) receptors and uses thereof. *Drug Discov Today.* 2007; 12(17-18): 748-56.
147. Lu S, Liow JS, et al. Evaluation of [¹⁴C]S14506 and [¹⁸F]S14506 in rat and monkey as agonist PET radioligands for brain 5-HT(1A) receptors. *Curr Radiopharm.* 2010; 3(1): 9-18.
148. Kumar JS, Majo VJ, et al. Synthesis and in vivo validation of [O-methyl-¹¹C]2-{4-[4-(7-methoxynaphthalen-1-yl)piperazin-1-yl]butyl}-4-methyl-2H-[1,2,4]triazine-3,5-dione: a novel 5-HT_{1A} receptor agonist positron emission tomography ligand. *J Med Chem.* 2006; 49(1): 125-34.
149. Kumar JS, Prabhakaran J, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a novel 5-HT_{1A} receptor agonist radioligand [O-methyl-¹¹C]2-(4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-methyl-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)dione in nonhuman primates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007; 34(7): 1050-60.
150. Milak MS, Severance AJ, et al. Modeling considerations for ¹¹C-CUMI-101, an agonist radiotracer for imaging serotonin 1A receptor in vivo with PET. *J Nucl Med.* 2008; 49(4): 587-96.

151. Kumar JS, Parsey RV, et al. Autoradiographic evaluation of [3H]CUMI-101, a novel, selective 5-HT_{1A} ligand in human and baboon brain. *Brain Res.* 2013; 1507: 11-8.
152. Shrestha SS, Liow JS, et al. (11)C-CUMI-101, a PET radioligand, behaves as a serotonin 1A receptor antagonist and also binds to alpha(1) adrenoceptors in brain. *J Nucl Med.* 2014; 55(1): 141-6.
153. Pike VW, McCarron JA, et al. Exquisite delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [carbonyl-11 C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 1996; 301(1-3): R5-7.
154. Saulin A, Savli M and Lanzenberger R. Serotonin and molecular neuroimaging in humans using PET. *Amino Acids.* 2012; 42(6): 2039-57.
155. Hume S, Hirani E, et al. Effect of 5-HT on binding of [(11)C] WAY 100635 to 5-HT(1A) receptors in rat brain, assessed using in vivo microdialysis and PET after fenfluramine. *Synapse.* 2001; 41(2): 150-9.
156. Zhuang ZP, Kung MP and Kung HF. Synthesis and evaluation of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]ethyl]piperazine (p-MPPI): a new iodinated 5-HT_{1A} ligand. *J Med Chem.* 1994; 37(10): 1406-7.
157. Thielen RJ and Frazer A. Effects of novel 5-HT_{1A} receptor antagonists on measures of post-synaptic 5-HT_{1A} receptor activation in vivo. *Life Sci.* 1995; 56(7): PL163-8.
158. Kung HF, Stevenson DA, et al. New 5-HT_{1A} receptor antagonist: [3H]p-MPPF. *Synapse.* 1996; 23(4): 344-6.
159. Shiue CY, Shiue GG, et al. P-[18F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT_{1A} receptors in humans. *Synapse.* 1997; 25(2): 147-54.
160. Le Bars D, Lemaire C, et al. High-yield radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of p-[18F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. *Nucl Med Biol.* 1998; 25(4): 343-50.
161. Plenevaux A, Lemaire C, et al. [(18)F]p-MPPF: aA radiolabeled antagonist for the study of 5-HT(1A) receptors with PET. *Nucl Med Biol.* 2000; 27(5): 467-71.
162. Plenevaux A, Weissmann D, et al. Tissue distribution, autoradiography, and metabolism of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2' -[N-2"-pyridinyl)-p-[(18)F]fluorobenzamido]ethyl]piperazine (p-[(18)F]MPPF), a new serotonin 5-HT(1A) antagonist for positron emission tomography: An In vivo study in rats. *J Neurochem.* 2000; 75(2): 803-11.
163. Aznavour N, Rbah L, et al. A PET imaging study of 5-HT(1A) receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. *Neuroimage.* 2006; 33(3): 834-42.
164. Ginovart N, Hassoun W, Le Bars D, Weissmann D and Levie V. In vivo characterization of p-[(18)F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635 for visualization of 5-HT(1a) receptors. *Synapse.* 2000; 35(3): 192-200.
165. Shively CA, Friedman DP, et al. Behavioral depression and positron emission tomography-determined serotonin 1A receptor binding potential in cynomolgus monkeys. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63(4): 396-403.

166. Passchier J, van Waarde A, et al. Quantitative imaging of 5-HT(1A) receptor binding in healthy volunteers with [(18)f]p-MPPF. *Nucl Med Biol*. 2000; 27(5): 473-6.
167. Aznavour N and Zimmer L. [18F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT1A receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology*. 2007; 52(3): 695-707.
168. Rudnick G. Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. *J Biol Chem*. 1977; 252(7): 2170-4.
169. Blakely RD, De Felice LJ and Hartzell HC. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol*. 1994; 196: 263-81.
170. Torres GE, Gainetdinov RR and Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(1): 13-25.
171. Huang Y, Zheng MQ and Gerdes JM. Development of effective PET and SPECT imaging agents for the serotonin transporter: has a twenty-year journey reached its destination? *Curr Top Med Chem*. 2010; 10(15): 1499-526.
172. Kalbitzer J, Frokjaer VG, et al. The personality trait openness is related to cerebral 5-HTT levels. *Neuroimage*. 2009; 45(2): 280-5.
173. Burke SM, van de Giessen E, et al. Serotonin and dopamine transporters in relation to neuropsychological functioning, personality traits and mood in young adult healthy subjects. *Psychol Med*. 2011; 41(2): 419-29.
174. Kupers R, Frokjaer VG, et al. Serotonin transporter binding in the hypothalamus correlates negatively with tonic heat pain ratings in healthy subjects: a [11C]DASB PET study. *Neuroimage*. 2011; 54(2): 1336-43.
175. Madsen K, Erritzoe D, et al. Cognitive function is related to fronto-striatal serotonin transporter levels--a brain PET study in young healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011; 213(2-3): 573-81.
176. Ichise M, Vines DC, et al. Effects of early life stress on [11C]DASB positron emission tomography imaging of serotonin transporters in adolescent peer- and mother-reared rhesus monkeys. *J Neurosci*. 2006; 26(17): 4638-43.
177. Reimold M, Knobel A, et al. Central serotonin transporter levels are associated with stress hormone response and anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011; 213(2-3): 563-72.
178. Daws LC and Gould GG. Ontogeny and regulation of the serotonin transporter: providing insights into human disorders. *Pharmacol Ther*. 2011; 131(1): 61-79.
179. Tsao CW, Lin YS, Chen CC, Bai CH and Wu SR. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006; 30(5): 899-905.
180. Lesch KP, Gross J, et al. Primary structure of the serotonin transporter in unipolar depression and bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 1995; 37(4): 215-23.

181. Hesse S, Stengler K, et al. The serotonin transporter availability in untreated early-onset and late-onset patients with obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14(5): 606-17.
182. Simpson HB, Lombardo I, et al. Serotonin transporters in obsessive-compulsive disorder: a positron emission tomography study with [(11)C]McN 5652. *Biol Psychiatry*. 2003; 54(12): 1414-21.
183. Brown AK, George DT, et al. PET [11C]DASB imaging of serotonin transporters in patients with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31(1): 28-32.
184. McCann UD, Szabo Z, et al. Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [11C]McN5652 and [11C]DASB. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30(9): 1741-50.
185. Selvaraj S, Hoshi R, et al. Brain serotonin transporter binding in former users of MDMA ('ecstasy'). *Br J Psychiatry*. 2009; 194(4): 355-9.
186. Erritzoe D, Frokjaer VG, et al. Cerebral serotonin transporter binding is inversely related to body mass index. *Neuroimage*. 2010; 52(1): 284-9.
187. Kasper S, Sacher J, et al. Differences in the dynamics of serotonin reuptake transporter occupancy may explain superior clinical efficacy of escitalopram versus citalopram. *Int Clin Psychopharmacol*. 2009; 24(3): 119-25.
188. Meyer JH. Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment. *J Psychiatry Neurosci*. 2007; 32(2): 86-102.
189. Zhu L, Li G, et al. An improved preparation of [18F]FPBM: a potential serotonin transporter (SERT) imaging agent. *Nucl Med Biol*. 2013; 40(8): 974-9.
190. Wang JL, Oya S, et al. In vivo studies of the SERT-selective [18F]FPBM and VMAT2-selective [18F]AV-133 radiotracers in a rat model of Parkinson's disease. *Nucl Med Biol*. 2010; 37(4): 479-86.
191. Yeh YW, Ho PS, et al. Disproportionate Reduction of Serotonin Transporter May Predict the Response and Adherence to Antidepressants in Patients with Major Depressive Disorder: A Positron Emission Tomography Study with 4-[18F]-ADAM. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015; 18(7): pyu120.
192. Huang WS, Huang SY, et al. PET imaging of the brain serotonin transporters (SERT) with N,N-dimethyl-2-(2-amino-4-[18F]fluorophenylthio)benzylamine (4-[18F]-ADAM) in humans: a preliminary study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013; 40(1): 115-24.
193. Poewe W and Luginger E. Depression in Parkinson's disease: impediments to recognition and treatment options. *Neurology*. 1999; 52(7 Suppl 3): S2-6.
194. Politis M, Wu K, et al. Parkinson's disease symptoms: the patient's perspective. *Mov Disord*. 2010; 25(11): 1646-51.
195. Marsden CD. Basal ganglia disease. *Lancet*. 1982; 2(8308): 1141-7.

196. Samii A, Nutt JG and Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 363(9423): 1783-93.
197. Jellinger KA. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol*. 1991; 14(3): 153-97.
198. Bernheimer H, Birkmayer W and Hornykiewicz O. [Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the human brain and its behavior in patients with Parkinson's syndrome]. *Klin Wochenschr*. 1961; 39: 1056-9.
199. Kish SJ. Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Adv Neurol*. 2003; 91: 39-49.
200. Langston JW. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol*. 2006; 59(4): 591-6.
201. Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RG, Blessing WW and Geffen LB. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res*. 1990; 510(1): 104-7.
202. Paulus W and Jellinger K. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1991; 50(6): 743-55.
203. Ohama E and Ikuta F. Parkinson's disease: distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. *Acta Neuropathol*. 1976; 34(4): 311-9.
204. Mann DM and Yates PO. Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1983; 9(1): 3-19.
205. Halliday GM, Li YW, et al. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1990; 27(4): 373-85.
206. Braak H, Del Tredici K, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(2): 197-211.
207. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H and Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004; 318(1): 121-34.
208. Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N and Brooks D. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*. 2005; 128(Pt 6): 1314-22.
209. Frisina PG, Haroutunian V and Libow LS. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009; 15(2): 144-8.
210. Fahn S, Libsch LR and Cutler RW. Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor. *J Neurol Sci*. 1971; 14(4): 427-55.
211. Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B and Agid Y. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res*. 1983; 275(2): 321-8.

212. Raisman R, Cash R and Agid Y. Parkinson's disease: decreased density of 3H-imipramine and 3H-paroxetine binding sites in putamen. *Neurology*. 1986; 36(4): 556-60.
213. Wilson JM, Levey AI, et al. Differential changes in neurochemical markers of striatal dopamine nerve terminals in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology*. 1996; 47(3): 718-26.
214. Kish SJ, Tong J, et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain*. 2008; 131(Pt 1): 120-31.
215. D'Amato RJ, Zweig RM, et al. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1987; 22(2): 229-36.
216. Caretti V, Stoffers D, et al. Loss of thalamic serotonin transporters in early drug-naïve Parkinson's disease patients is associated with tremor: an [(123)I]beta-CIT SPECT study. *J Neural Transm*. 2008; 115(5): 721-9.
217. Berding G, Brucke T, et al. [(123)I]beta-CIT SPECT imaging of dopamine and serotonin transporters in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nuklearmedizin*. 2003; 42(1): 31-8.
218. Murai T, Muller U, et al. In vivo evidence for differential association of striatal dopamine and midbrain serotonin systems with neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2001; 13(2): 222-8.
219. Hauser RA, Lyons KE and Pahwa R. The UPDRS-8: a brief clinical assessment scale for Parkinson's disease. *Int J Neurosci*. 2012; 122(7): 333-7.
220. Strecker K, Wegner F, et al. Preserved serotonin transporter binding in de novo Parkinson's disease: negative correlation with the dopamine transporter. *J Neurol*. 2011; 258(1): 19-26.
221. Brucke T, Kornhuber J, et al. SPECT imaging of dopamine and serotonin transporters with [(123)I]beta-CIT. Binding kinetics in the human brain. *J Neural Transm Gen Sect*. 1993; 94(2): 137-46.
222. Guttman M, Boileau I, et al. Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2007; 14(5): 523-8.
223. Albin RL, Koeppe RA, et al. Sparing of caudal brainstem SERT binding in early Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(3): 441-4.
224. Politis M, Wu K, et al. Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's disease: an in vivo 11C-DASB PET study. *Neurobiol Dis*. 2010; 40(1): 216-21.
225. Kim SE, Choi JY, Choe YS, Choi Y and Lee WY. Serotonin transporters in the midbrain of Parkinson's disease patients: a study with 123I-beta-CIT SPECT. *J Nucl Med*. 2003; 44(6): 870-6.
226. Haapaniemi TH, Ahonen A, Torniainen P, Sotaniemi KA and Myllylä VV. [(123)I]beta-CIT SPECT demonstrates decreased brain dopamine and serotonin transporter levels in untreated parkinsonian patients. *Mov Disord*. 2001; 16(1): 124-30.

227. Boileau I, Warsh JJ, et al. Elevated serotonin transporter binding in depressed patients with Parkinson's disease: a preliminary PET study with [¹¹C]DASB. *Mov Disord.* 2008; 23(12): 1776-80.
228. Politis M, Wu K, et al. Depressive symptoms in PD correlate with higher 5-HTT binding in raphe and limbic structures. *Neurology.* 2010; 75(21): 1920-7.
229. Chen CP, Alder JT, et al. Post-synaptic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors are increased in Parkinson's disease neocortex. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 861: 288-9.
230. Chinaglia G, Landwehrmeyer B, Probst A and Palacios JM. Serotonergic terminal transporters are differentially affected in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: an autoradiographic study with [³H]citalopram. *Neuroscience.* 1993; 54(3): 691-9.
231. Rylander D, Parent M, et al. Maladaptive plasticity of serotonin axon terminals in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol.* 2010; 68(5): 619-28.
232. Richard IH and Kurlan R. A survey of antidepressant drug use in Parkinson's disease. Parkinson Study Group. *Neurology.* 1997; 49(4): 1168-70.
233. Chen P, Kales HC, et al. Antidepressant treatment of veterans with Parkinson's disease and depression: analysis of a national sample. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2007; 20(3): 161-5.
234. Rampello L, Chiechio S, Raffaele R, Vecchio I and Nicoletti F. The SSRI, citalopram, improves bradykinesia in patients with Parkinson's disease treated with L-dopa. *Clin Neuropharmacol.* 2002; 25(1): 21-4.
235. Menza M, Marin H, Kaufman K, Mark M and Lauritano M. Citalopram treatment of depression in Parkinson's disease: the impact on anxiety, disability, and cognition. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2004; 16(3): 315-9.
236. Palhagen SE, Carlsson M, Curman E, Walinder J and Granerus AK. Depressive illness in Parkinson's disease--indication of a more advanced and widespread neurodegenerative process? *Acta Neurol Scand.* 2008; 117(5): 295-304.
237. Fregni F, Santos CM, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation is as effective as fluoxetine in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004; 75(8): 1171-4.
238. McCance-Katz EF, Marek KL and Price LH. Serotonergic dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Neurology.* 1992; 42(9): 1813-4.
239. Ceravolo R, Nuti A, et al. Paroxetine in Parkinson's disease: effects on motor and depressive symptoms. *Neurology.* 2000; 55(8): 1216-8.
240. Tesei S, Antonini A, et al. Tolerability of paroxetine in Parkinson's disease: a prospective study. *Mov Disord.* 2000; 15(5): 986-9.
241. Hauser RA and Zesiewicz TA. Sertraline for the treatment of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1997; 12(5): 756-9.

242. Antonini A, Tesei S, et al. Randomized study of sertraline and low-dose amitriptyline in patients with Parkinson's disease and depression: effect on quality of life. *Mov Disord.* 2006; 21(8): 1119-22.
243. Leentjens AF, Vreeling FW, Luijckx GJ and Verhey FR. SSRIs in the treatment of depression in Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2003; 18(6): 552-4.
244. Seppi K, Weintraub D, et al. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011; 26 Suppl 3: S42-80.
245. Richard IH, McDermott MP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antidepressants in Parkinson disease. *Neurology.* 2012; 78(16): 1229-36.
246. Bishop C, George JA, et al. Serotonin transporter inhibition attenuates l-DOPA-induced dyskinesia without compromising l-DOPA efficacy in hemi-parkinsonian rats. *Eur J Neurosci.* 2012; 36(6): 2839-48.
247. Kuan WL, Zhao JW and Barker RA. The role of anxiety in the development of levodopa-induced dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease, and the effect of chronic treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram. *Psychopharmacology (Berl).* 2008; 197(2): 279-93.
248. Durif F, Vidailhet M, Bonnet AM, Blin J and Agid Y. Levodopa-induced dyskinesias are improved by fluoxetine. *Neurology.* 1995; 45(10): 1855-8.
249. Caley CF and Friedman JH. Does fluoxetine exacerbate Parkinson's disease? *J Clin Psychiatry.* 1992; 53(8): 278-82.
250. Gatto EM, Fernandez Pardal M and Micheli F. [Exacerbation of parkinsonism caused by fluoxetine]. *Medicina (B Aires).* 1994; 54(2): 182.
251. Friedman EH. Activation associated with fluoxetine therapy. *J Clin Psychopharmacol.* 1992; 12(3): 219-21.
252. Montastruc JL, Fabre N, et al. Does fluoxetine aggravate Parkinson's disease? A pilot prospective study. *Mov Disord.* 1995; 10(3): 355-7.
253. Paumier KL, Siderowf AD, et al. Tricyclic antidepressants delay the need for dopaminergic therapy in early Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012; 27(7): 880-7.
254. Hoglinger GU, Rizk P, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 2004; 7(7): 726-35.
255. Suzuki K, Okada K, et al. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9260.
256. Kohl Z, Winner B, et al. Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. *Eur J Neurosci.* 2012; 35(1): 10-9.

257. Chung YC, Kim SR, et al. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuropharmacology*. 2011; 60(6): 963-74.
258. Ballanger B, Klinger H, et al. Role of serotonergic 1A receptor dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(1): 84-9.
259. Doder M, Rabiner EA, Turjanski N, Lees AJ and Brooks DJ. Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: an 11C-WAY 100635 PET study. *Neurology*. 2003; 60(4): 601-5.
260. Huot P, Johnston TH, et al. Increased levels of 5-HT_{1A} receptor binding in ventral visual pathways in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(6): 735-42.
261. Sharp SI, Ballard CG, et al. Cortical serotonin 1A receptor levels are associated with depression in patients with dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008; 26(4): 330-8.
262. Huot P, Johnston TH, et al. Regulation of cortical and striatal 5-HT_{1A} receptors in the MPTP-lesioned macaque. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(1): 207 e9-19.
263. Descarries L and Riad M. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012; 367(1601): 2416-25.
264. Carta M, Carlsson T, Kirik D and Bjorklund A. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain*. 2007; 130(Pt 7): 1819-33.
265. Dupre KB, Eskow KL, Barnum CJ and Bishop C. Striatal 5-HT_{1A} receptor stimulation reduces D1 receptor-induced dyskinesia and improves movement in the hemiparkinsonian rat. *Neuropharmacology*. 2008; 55(8): 1321-8.
266. Dupre KB, Eskow KL, Negron G and Bishop C. The differential effects of 5-HT_{1A} receptor stimulation on dopamine receptor-mediated abnormal involuntary movements and rotations in the primed hemiparkinsonian rat. *Brain Res*. 2007; 1158: 135-43.
267. Lundblad M, Usiello A, et al. Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol*. 2005; 194(1): 66-75.
268. Eskow KL, Gupta V, Alam S, Park JY and Bishop C. The partial 5-HT_{1A} agonist buspirone reduces the expression and development of l-DOPA-induced dyskinesia in rats and improves l-DOPA efficacy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007; 87(3): 306-14.
269. Dekundy A, Lundblad M, Danysz W and Cenci MA. Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behav Brain Res*. 2007; 179(1): 76-89.
270. Tani Y, Ogata A, Koyama M and Inoue T. Effects of piclozotan (SUN N4057), a partial serotonin 1A receptor agonist, on motor complications induced by repeated administration of levodopa in parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol*. 2010; 649(1-3): 218-23.

271. Marin C, Aguilar E, Rodriguez-Oroz MC, Bartoszyk GD and Obeso JA. Local administration of sarizotan into the subthalamic nucleus attenuates levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 204(2): 241-50.
272. Iravani MM, Tayarani-Binazir K, Chu WB, Jackson MJ and Jenner P. In 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated primates, the selective 5-hydroxytryptamine 1a agonist (R)-(+)-8-OHDPAT inhibits levodopa-induced dyskinesia but only with\ increased motor disability. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319(3): 1225-34.
273. Bibbiani F, Oh JD and Chase TN. Serotonin 5-HT1A agonist improves motor complications in rodent and primate parkinsonian models. *Neurology*. 2001; 57(10): 1829-34.
274. Bonifati V, Fabrizio E, Cipriani R, Vanacore N and Meco G. Buspirone in levodopa-induced dyskinesias. *Clin Neuropharmacol*. 1994; 17(1): 73-82.
275. Hammerstad JP, Carter J, et al. Buspirone in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 1986; 9(6): 556-60.
276. Kleedorfer B, Lees AJ and Stern GM. Buspirone in the treatment of levodopa induced dyskinesias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991; 54(4): 376-7.
277. Ludwig CL, Weinberger DR, et al. Buspirone, Parkinson's disease, and the locus ceruleus. *Clin Neuropharmacol*. 1986; 9(4): 373-8.
278. Meco G, Fabrizio E, Di Rezze S, Alessandri A and Pratesi L. Mirtazapine in L-dopa-induced dyskinesias. *Clin Neuropharmacol*. 2003; 26(4): 179-81.
279. Pact V and Giduz T. Mirtazapine treats resting tremor, essential tremor, and levodopa-induced dyskinesias. *Neurology*. 1999; 53(5): 1154.
280. Olanow CW, Damier P, et al. Multicenter, open-label, trial of sarizotan in Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias (the SPLENDID Study). *Clin Neuropharmacol*. 2004; 27(2): 58-62.
281. Goetz CG, Damier P, et al. Sarizotan as a treatment for dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord*. 2007; 22(2): 179-86.
282. Francis PT. Biochemical and pathological correlates of cognitive and behavioural change in DLB/PDD. *J Neurol*. 2009; 256 Suppl 3: 280-5.
283. Sharp SI, Ballard C, et al. Sertonin-1A receptor binding to frontal cortex in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. 2005.
284. Ballard C, Johnson M, et al. A positive association between 5HT re-uptake binding sites and depression in dementia with Lewy bodies. *J Affect Disord*. 2002; 69(1-3): 219-23.
285. Suwijn SR, Berendse HW, Verschuur CV, de Bie RM and Booij J. Serotonin transporter availability in early stage Parkinson's disease and multiple system atrophy. *ISRN Neurol*. 2014; 2014: 345132.

286.

<http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=21682&info=CLASS>.

287. Barthel H, Schroeter ML, Hoffmann KT and Sabri O. PET/MR in dementia and other neurodegenerative diseases. *Semin Nucl Med*. 2015; 45(3): 224-33.

288. Lozza C, Marie RM and Baron JC. The metabolic substrates of bradykinesia and tremor in uncomplicated Parkinson's disease. *Neuroimage*. 2002; 17(2): 688-99.

289. Antonini A, Kazumata K, et al. Differential diagnosis of parkinsonism with [18F]fluorodeoxyglucose and PET. *Mov Disord*. 1998; 13(2): 268-74.

290. Eidelberg D, Moeller JR, et al. The metabolic topography of parkinsonism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994; 14(5): 783-801.

291. Berding G, Odin P, et al. Resting regional cerebral glucose metabolism in advanced Parkinson's disease studied in the off and on conditions with [(18)F]FDG-PET. *Mov Disord*. 2001; 16(6): 1014-22.

292. Mentis MJ, McIntosh AR, et al. Relationships among the metabolic patterns that correlate with mnemonic, visuospatial, and mood symptoms in Parkinson's disease. *Am J Psychiatry*. 2002; 159(5): 746-54.

293. Feigin A, Fukuda M, et al. Metabolic correlates of levodopa response in Parkinson's disease. *Neurology*. 2001; 57(11): 2083-8.

294. Akdemir UO, Tokcaer AB, Karakus A and Kapucu LO. Brain 18F-FDG PET imaging in the differential diagnosis of parkinsonism. *Clin Nucl Med*. 2014; 39(3): e220-6.

295. Kasanuki K, Iseki E, et al. Neuropathological investigation of the hypometabolic regions on positron emission tomography with [18F] fluorodeoxyglucose in patients with dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci*. 2012; 314(1-2): 111-9.

296. Ishii K, Hosokawa C, et al. Regional glucose metabolic reduction in dementia with Lewy bodies is independent of amyloid deposition. *Ann Nucl Med*. 2015; 29(1): 78-83.

297. Lemaire C, Plenevaux A, et al. Solid phase extraction—an alternative to the use of rotary evaporators for solvent removal in the rapid formulation of PET radiopharmaceuticals. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 1999; 42(1): 63-75.

298. Giasson BI, Duda JE, et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 2002; 34(4): 521-33.

299. Mougenot AL, Nicot S, et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(9): 2225-8.

300. Betemps D, Verchere J, et al. Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological alpha-synuclein by enhanced ELISA. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2(1): 29.

301. Paxinos G and Franklin KBJ (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam ; Boston, Elsevier Academic Press.

302. Lancelot S and Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31(9): 411-7.
303. Beyer K and Ariza A. Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: commonalities and differences. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007; 66(11): 965-74.
304. Spillantini MG, Crowther RA, et al. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett.* 1998; 251(3): 205-8.
305. Spillantini MG, Schmidt ML, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997; 388(6645): 839-40.
306. Harikumar KG and Chattopadhyay A. Modulation of agonist and antagonist interactions in serotonin 1A receptors by alcohols. *FEBS Lett.* 1998; 438(1-2): 96-100.
307. Chalon S, Hall H, et al. Pharmacological characterization of (E)-N-(4-fluorobut-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4'-tolyl)nortropine (LBT-999) as a highly promising fluorinated ligand for the dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 317(1): 147-52.
308. Guilloteau D, Emond P, et al. Exploration of the dopamine transporter: in vitro and in vivo characterization of a high-affinity and high-specificity iodinated tropane derivative (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4'-m ethylph enyl)nortropine (PE2I). *Nucl Med Biol.* 1998; 25(4): 331-7.
309. Paxinos G and Franklin KBJ. The rat brain in stereotaxic coordinates 1986; (Elsevier Academic Press).
310. Lansbury PT, Justman CJ and Shinobu L. Imaging of alpha-synuclein. 2009; (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 88pp.
311. Ribeiro Morais G, Vicente Miranda H, et al. Synthesis and in vitro evaluation of fluorinated styryl benzazoles as amyloid-probes. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19(24): 7698-710.
312. Ye L, Velasco A, et al. In vitro high affinity alpha-synuclein binding sites for the amyloid imaging agent PIB are not matched by binding to Lewy bodies in postmortem human brain. *J Neurochem.* 2008; 105(4): 1428-37.
313. Klunk WE, Lopresti BJ, et al. Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J Neurosci.* 2005; 25(46): 10598-606.
314. Petkova AT, Leapman RD, et al. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science.* 2005; 307(5707): 262-5.
315. Lu JX, Qiang W, et al. Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell.* 2013; 154(6): 1257-68.
316. Levigoureux E, Lancelot S, et al. Binding of the PET radiotracer [(1)(8)F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res.* 2014; 11(10): 955-60.

317. Logan J, Fowler JS, et al. Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16(5): 834-40.
318. Waldron AM, Wyffels L, et al. Quantitative muPET Imaging of Cerebral Glucose Metabolism and Amyloidosis in the TASTPM Double Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2015; 12(7): 694-703.
319. Platt FM, Wassif C, et al. Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014; 15: 173-94.
320. Paumier KL, Sukoff Rizzo SJ, et al. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One.* 2013; 8(8): e70274.
321. Verduran M, Berod A, Le Bars D and Zimmer L. Effects of amyloid-beta peptides on the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* 2011; 32(1): 103-14.
322. Becker G, Streichenberger N, Billard T, Newman-Tancredi A and Zimmer L. A postmortem study to compare agonist and antagonist 5-HT_{1A} receptor-binding sites in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther.* 2014; 20(10): 930-4.
323. Deusser J, Schmidt S, et al. Serotonergic dysfunction in the A53T alpha-synuclein mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2015.
324. Graham DR and Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J Neurosci Res.* 2010; 88(8): 1777-83.
325. Yamakado H, Moriwaki Y, et al. alpha-Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res.* 2012; 73(2): 173-7.